

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002454

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: 04090483.1  
Filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 May 2005 (24.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04090483.1

EP/05/2454

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk





Anmeldung Nr:  
Application no.: 04090483.1  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 09.12.04  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit Stärke phosphorylierender  
enzymatischer Aktivität

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

G12Q1/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LT LU  
MC NL PL PT RO SE SI SK TR LI



**Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit Stärke**  
5 **phosphorylierender enzymatischer Aktivität**

***Beschreibung***

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von Proteinen die an  
10 der Phosphorylierung von Stärke beteiligt sind, sowie Nucleinsäuren, die solche  
Proteine codieren. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Pflanzenzellen und  
Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines mit den erfindungsgemäßen Verfahren  
identifizierbaren Proteins aufweisen. Solche Pflanzenzellen und Pflanzen  
synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch  
15 die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke  
sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, als auch die Herstellung von  
Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als  
20 erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben  
der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen  
Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine  
Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu  
ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

25

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den  
Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch  
unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des  
Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren

physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngroße von Stärken werden neben dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis beeinflusst durch das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngroße die Stärkekornmorphologie etc.. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebunden ist (im Folgenden als Stärkephosphat bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden. Der Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Stärke ist dabei neben dem Phosphatgehalt auch Abhängig von der Form, (Stärkephosphat oder Phospholipide)

in welcher das Phosphat in der Stärke vorliegt (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832).

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B.  
5 bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls  
10 weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt  
15 beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2-, C-3- oder C-6-Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971,  
20 Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Stärkephosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et  
25 al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6-Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol  
30 pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem



Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zur Zeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

5

In transgenen Pflanzen konnte die Menge an Stärkephosphat in Speicherstärken verändert werden. So zeigt Speicherstärke aus Kartoffelpflanzen, die eine reduzierte Aktivität einer löslichen Stärkesynthase III (Abel et al., 1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991), eines Verzweigungsenzyms I (BEI) (Safford et al., 1998, Carbohydrate  
10 Polymers 35, 155-168), eines Verzweigungsenzyms II (BEII) (Jobling et al., 1999, The Plant Journal 18, 163-171), eines BEI und eines BEII (Schwall et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 551- 554), eines Disproportionierungsenzyms (WO 96 27673) oder eines Disproportionierungsenzyms und eines BEI (WO 95 07355) aufweisen, gegenüber Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen einen  
15 gesteigerten Gehalt an Stärkephosphat. Die Reduktion des Gehaltes an Stärkephosphat in diesen Pflanzen beruht jedoch nicht darauf, dass die Proteine, deren Aktivität in diesen Pflanzen reduziert ist, direkt an der Einführung von Phosphatresten in die Stärke beteiligt sind. Die Steigerung des Gehaltes von Stärkephosphat in den betreffenden transgenen Pflanzen ist daher kein primärer,  
20 sondern ein sekundärer Effekt, der durch Reduzierung der entsprechenden Proteine hervorgerufen wird. Die Ursache für die Steigerung des Gehaltes an Stärkephosphat durch Veränderung der genannten Proteinaktivitäten ist bisher noch ungeklärt. Daher ist eine gezielte Veränderung des Gehaltes an Stärkephosphat durch Veränderung von Proteinaktivitäten, welche nur durch einen sekundären Effekt den Gehalt an  
25 Stärkephosphat beeinflussen, nicht möglich. Weiterhin bewirkt die Veränderung der Aktivitäten von Proteinen, die als sekundären Effekt einen Einfluss auf den Gehalt von Stärkephosphat in Pflanzen haben, gleichzeitig auch weitere Veränderungen der Stärke, wie z.B: Veränderung des Amylose/Amylopektin Verhältnisses und/oder der Länge der Seitenketten des Amylopektins, welche den primären Effekt der  
30 Veränderungen solcher Proteinaktivitäten darstellt.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses

Protein, in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet, ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und hat die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (E.C. 2.7.9.4). In der von R1 katalysierten Reaktion werden

5 die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (phosphorylierte Stärke), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6 und die C-3 Position

10 der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke

15 gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-

20 Glucane einführen.

Die Aminosäuresequenz von R1 enthält eine Domäne, die zu Domänen von bekannten Pyruvat-Phosphat-Dikinasen (PPDK-Domäne) und bekannten Pyruvat-Wasser-Dikinasen (PPS-Domäne) einen hohen Grad an Homologie aufweist und einen in PPDK- und PPS-Domänen konservierten Histidinrest beinhaltet. Bei der

25 Übertragung von Phosphatresten des ATP auf alpha-1,4-Glucane (Stärke) entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1-Protein, wobei ein Phosphatrest kovalent an den in der PPDK- oder der PPS-Domäne konservierten Histidinrest gebunden vorliegt (Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532).

Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel

30 (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444,

GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben.

- 5 Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

10

- Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen  
15 von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

- 20 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, Verfahren und Mittel zur Erzeugung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren zur Verfügung zu stellen.

25

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

- Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines  
30 Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-

1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin

a) Proteinextrakte in voneinander getrennten Ansätzen mit

i phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und

5 ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen

inkubiert werden,

b) spezifisch an die

i phosphorylierten-alpha-1,4-Glucose aus Schritt a) i gebundene Proteine und

10 ii nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucose aus Schritt a) ii gebundene Proteine

in getrennten Ansätzen voneinander in Lösung gebracht werden und

c) Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt b) i, im Vergleich zu

15 nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt b) ii, aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen  
20 aufweist, handelt es sich bei dem alpha-1,4-Glucan, zu welchem eine höhere Bindungsaktivität besteht, um Stärke, bevorzugt um granuläre Stärke.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen  
25 aufweist, betrifft ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin die Bindungsaktivität zu P-alpha-1,4-Glucanen mindestens 3-fach, bevorzugt mindestens 4-fach, besonders bevorzugt mindestens 5-fach und insbesondere bevorzugt mindestens 6-fach erhöht ist im Vergleich zur Bindungsaktivität zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen.

- 10 Die Menge an Protein welche an P-alpha-1,4-Glucane bzw. nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane bindet, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay).
- 15 Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als
- 20 Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem erfindungsgemäßen Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 11 ).

- Durch Vergleich der bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur
- 25 Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, erhaltenen in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucan-bindenden-Proteine mit den erhaltenen in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan-bindenden-Proteine, können Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte
  - 30 Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, werden die durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt a) i erhaltenen P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe und die durch Inkubation von Proteinextrakten mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt a) ii erhaltenen nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe von den nicht an die betreffenden alpha-1,4-Glucose gebundenen Proteinen getrennt. Die Trennung findet dabei für die jeweiligen Inkubationslösungen nach Verfahrensschritt a) i bzw. nach Verfahrensschritt a) ii separat statt.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, werden die nach Schritt b) i bzw. b) ii in Lösung gebrachten Proteine von den in erfindungsgemäßen Verfahren nach Schritt a) i bzw. Schritt a) ii eingesetzten alpha-1,4-Glucanen abgetrennt.

Bei den nach erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, erhaltenen nach Verfahrensschritt b) i in Lösung gebrachten Proteinen kann es sich entweder um ein einziges oder um mehrere Proteine handeln. Auch bei den nach Verfahrensschritt b) ii in Lösung gebrachten Proteinen kann es sich entweder um ein einziges oder um mehrere Proteine handeln. Sollte es sich bei den in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucan-bindenden-Proteinen bzw. bei den in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucose-bindenden-Proteinen jeweils um mehrere unterschiedliche Proteine handeln, werden diese gegebenenfalls voneinander getrennt werden.

In einer weiteren Ausführungsform, erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, werden die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren die nach  
5 Verfahrensschritt b) i in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine bzw. die nach Verfahrensschritt b) ii in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine, voneinander getrennt.

Die Auftrennung der in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine bzw. der in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-  
10 Proteine, kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese etc. erfolgen. Bevorzugt werden die in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane bindenden Proteine bzw. die in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane bindenden Proteine mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese, besonders bevorzugt mit der weiter unten  
15 (siehe Allgemeine Methoden 9) beschriebenen Methode voneinander getrennt.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, worin

- 20 a) Proteinextrakte mit phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen inkubiert werden,  
b) spezifisch an die phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) gebundene Proteine in Lösung gebracht werden,  
c) Proteine erhalten nach Schritt b) jeweils mit  
i) ATP und phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und  
25 ii) ATP und nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen  
in voneinander getrennten Ansätzen inkubiert werden,  
d) das nach Inkubation in Schritt c) i bzw. c) ii erhaltene jeweilige alpha-1,4-Glucan auf Einführung weiterer Phosphatgruppen hin untersucht wird und  
e) Proteine, identifiziert werden, die im Inkubationsansatz nach c) i signifikante  
30 Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben und im

Inkubationsansatz nach c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der  
5 vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

10

Unter dem Begriff „alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Glucan verstanden werden, welches hauptsächlich aus alpha-1,4-verknüpften Glucosebausteinen besteht, jedoch auch alpha-1,6-Verknüpfungen als Verzweigungen enthalten kann. Bevorzugt enthält ein alpha-1,4-Glucan bis zu 15%,  
15 besonders bevorzugt bis zu 10% und insbesondere bevorzugt bis zu 5% an alpha-1,6-Verknüpfungen.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebundene  
20 Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein alpha-1,4-Glucan verstanden werden, welches keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält.

25

Unter dem Begriff „phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan“ oder „P-alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein alpha-1,4-Glucan verstanden werden, welches Stärkephosphat enthält.



Grundsätzlich kann ein Protein, identifizierbar mit einem erfindungsgemäßen Verfahren aus jedem Organismus stammen. Vorzugsweise stammt das Protein aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süsskartoffel, Sago, Mungbohne, 5 Banane, Erbse, *Arabidopsis*, *Curcuma* oder Sorghum), besonders bevorzugt aus Kartoffel-, Gerste-, Zuckerrüben- *Arabidopsis*- oder Reispflanzen und insbesondere bevorzugt *Arabidopsis*- oder Reispflanzen.

10 In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren stammen die Proteinextrakte aus eukaryontischen Zellen, bevorzugt aus Pflanzenzellen, besonders bevorzugt aus Zellen von Stärke speichernden (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süsskartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, *Arabidopsis*, *Curcuma* oder Sorghum ) Pflanzen.

15 Zur Inkubation von Proteinextrakten mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen sind für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante 20 *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden 2) beschriebene Methode zur 25 Isolierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen verwendet.

Zur Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren sind grundsätzlich alle alpha-1,4-Glucane geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit Proteinextrakten 30 pflanzliche P-alpha-1,4-Glucane eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine

nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Eine nachträgliche enzymatische Phosphorylierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen kann mit jedem Enzym durchgeführt werden, welches  
5 Phosphatreste durch Einführung von kovalenten Bindungen auf nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane überträgt. Bevorzugt wird hierfür ein Enzym mit der Aktivität einer Wasser-Glucan-Dikinase (R1 Protein, E.C.: 2.7.9.4) verwendet (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532). Bevorzugt wird für die nachträgliche enzymatische Phosphorylierung  
10 von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen ein gereinigtes R1 Protein, insbesondere ein durch heterologe Expression in *E. coli* produziertes R1 Protein aus Kartoffel verwendet.

Methoden zur Reinigung eines rekombinant durch Expression in *E. coli* produzierten R1 Proteins sind z.B. beschrieben bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) und  
15 Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal 377, 525-532).

Bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren können durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen und/oder nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen durch die Bindung von Proteinen an P-alpha-1,4-Glucane P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe und durch die Bindung von Proteinen an nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe entstehen.  
20

Die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren werden die in P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen vorliegenden Proteine erfindungsgemäß in Lösung gebracht, d.h. die Bindung der betreffenden Proteine an die jeweiligen alpha-1,4-Glucane wird aufgehoben. Damit werden in Lösung gebrachte P-alpha-1,4-Glucane-bindende-Proteine und/oder in Lösung gebrachte nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-bindende-Proteine erhalten. Zur Aufhebung der Bindung zwischen den betreffenden alpha-1,4-Glucanen und den an sie gebundenen Proteinen sind grundsätzlich alle Substanzen verwendbar, die die bestehende Protein-alpha-1,4-Glucan Interaktion  
30

unterbinden. Bevorzugt werden dazu Pufferlösungen, enthaltend Detergenzien, besonders bevorzugt Pufferlösungen, enthaltend Natriumlaurylsulfat (SDS), insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Pufferlösung (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet.

5

Zur Trennung von alpha-1,4-Glucanen von ATP und/oder Proteinen ist grundsätzlich jede Methode geeignet, die es erlaubt, alpha-1,4-Glucane von den sich in Lösung befindlichen Substanzen, wie Proteine und z.B. ATP, des Inkubationsansatzes zu trennen. Werden für die Inkubation von Proteinextrakten mit alpha-1,4-Glucanen bei  
10 der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren lösliche alpha-1,4-Glucane verwendet, so kann die Trennung z.B. eine Präzipitation der alpha-1,4-Glucane, bevorzugt eine Präzipitation mit geeigneten Lösungsmitteln, besonders bevorzugt eine Präzipitation mit Alkoholen, beinhalten. Auch die Abtrennung von alpha-1,4-Glucanen durch Bindung an Substanzen, die selektiv alpha-1,4-Glucane binden (z.B.  
15 Concavalin A) ist zur Durchführung der Trennung von alpha-1,4-Glucanen von sich in Lösung befindlichen Substanzen, geeignet

Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der alpha-1,4-Glucane eine Filtration verwendet, besonders bevorzugt eine Zentrifugation, insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet.

20

Bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, können zur Trennung von löslichen Proteinen von den betreffenden alpha-1,4-Glucanen grundsätzlich alle dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. chromatographische Methoden, Präzipitation und anschließende Zentrifugation des alpha-1,4-Glucans,  
25 enzymatischer Verdau der alpha-1,4-Glucane, Gelfiltration etc. verwendet werden, die zur Trennung von löslichen Proteinen von alpha-1,4-Glucanen führen. Bevorzugt werden die in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine und/oder in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine von den in erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten alpha-1,4-Glucanen mit Hilfe  
30 von Zentrifugation getrennt.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Abtrennung von an P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen von nicht in den betreffenden Komplexen enthaltenen Proteinen eine Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens verwendet.

- 5 Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der nicht an die alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteine die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet. Nach erfolgter Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens befinden sich die nicht an P-alpha-1,4-Glucane bzw. nicht an nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteine im Überstand des  
10 Zentrifugationsmediums, während die P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe im sedimentierten Pellet vorliegen. Der Überstand des Zentrifugationsmediums wird verworfen, und das Pellet vorzugsweise zur weiteren Aufreinigung der P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe mit dem zur  
15 Inkubation verwendeten Puffer gewaschen. Bevorzugt wird das Pellet einmal, besonders bevorzugt zweimal gewaschen.

Grundsätzlich können zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende  
20 enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, jegliche Art von Proteinextrakten eingesetzt werden. Es kann sich dabei sowohl um so genannte Proteinrohextrakte, als auch um teilweise oder vollständig aufgereinigte Proteinextrakte handeln. So ist es z.B. von Vorteil, Proteine einzusetzen, welche mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung  
25 eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, identifiziert wurden. Proteine, welche mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht  
30 phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, identifiziert wurden, können z.B. unter Auslassung der Verfahrensschritte a) und b) direkt in Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-

1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, eingesetzt werden.

- Zur Herstellung von Proteinextrakten aus prokaryontischen oder eukaryontischen
- 5 Organismen für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, sind grundsätzlich alle dem Fachmann bekannten allgemeinen Methoden, wie z.B. bei Scopes (1993, Protein Purification: Principles & Practice, ISSN: 038794072) beschrieben, geeignet. Bevorzugt werden zur Durchführung der Verfahren jedoch Methoden zur Isolierung von pflanzlichen Proteinen (z.B. beschrieben bei Bollag et al, 1996, in: „Protein
- 10 Methods“, 2nd Edition, Wiley, ISBN: 0-471-11837-0; Dennison, 2003, in: „A Guide to Protein Isolation“ 2nd Edition, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1224-1), besonders bevorzugt das weiter unten beschriebene Verfahren (siehe Allgemeine Methoden 1) verwendet.
- 15 Die Inkubation der Proteinextrakte zur Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen findet in getrennten Ansätzen statt. Die betreffenden Ansätze für P-alpha-1,4-Glucane bzw. nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane werden während der Durchführung des gesamten Verfahrens getrennt voneinander behandelt. Dabei sind jeweils gleiche
- 20 Mengen von Proteinextrakt mit jeweils gleichen Mengen an P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen zu inkubieren. Bevorzugt werden jeweils 1 bis 10 mg, besonders bevorzugt 3 bis 7 mg und insbesondere bevorzugt 4 bis 6 mg Proteinextrakt mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen inkubiert. Die Menge der eingesetzten P-alpha-1,4-Glucane, bzw. der
- 25 nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane beträgt bevorzugt jeweils 10 bis 100 mg, besonders bevorzugt 30 bis 70 mg und insbesondere bevorzugt 45 bis 55 mg.

- Für die Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen zur Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, können verschiedene Puffer verwendet werden.
- 30 Grundsätzlich sind alle Puffer geeignet, die die Bindung der zu identifizierenden Proteine an das betreffende Substrat erlauben. Bevorzugt wird der weiter unten beschriebene Puffer (siehe Allgemeine Methoden 1) verwendet.

- Unter dem Begriff „Protein, das eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt“, soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Protein verstanden werden, welches Phosphatreste kovalent in P-alpha-1,4-Glucane
- 5 einführt, also P-alpha-1,4-Glucane als Substrat für die Übertragung von Phosphatresten verwendet, während nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane von einem betreffenden Protein nicht phosphoryliert werden, d.h. nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane dienen nicht als Substart für eine Phosphorylierungsreaktion.
- 10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ATP als weiteres Substrat verwendet.
- 15 ATP wird in dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung als weiteres Substrat (Co-Substrat) von dem Protein, das eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, verwendet, d.h. das betreffende Protein überträgt einen Phosphatrest von ATP auf ein bereits phosphoryliertes P-alpha-1,4-Glucan.
- 20 Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines Proteins, welches ATP als Co-Substrat zur Übertragung von Phosphatresten auf P-alpha-1,4-Glucane verwendet, z.B. durch Verwendung von ATP, welches einen markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-
- 25 Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  markiert ist, verwendet. Wird ein P-alpha-Glucan phosphorylierendes Protein mit P-alpha-1,4-Glucanen in Gegenwart von markiertem
- 30 ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an das P-alpha-1,4-Glucan gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Dabei können die P-alpha-Glucane sowohl in Form von Stärkephosphat enthaltender pflanzlicher Stärke

(Kartoffelstärke, Stärke aus *Curcuma armada*, *C. zedoaria*, *C. longa*, Reis, Mungbohne, Tapioca etc.), als auch in Form von enzymatisch phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucanen oder chemisch-phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucanen vorliegen. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders  
5 bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein Protein in ein P-alpha-1,4-Glucan eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung des markierten P-alpha-1,4-Glucans (z.B. durch Ausfällen der alpha-1,4-Glucane mittels Ethanol,  
10 Filtration, chromatographische Methoden, Zentrifugation etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der betreffenden P-alpha-1,4-Glucan Fraktion. Die in der P-alpha-1,4-Glucan Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-alpha-1,4-Glucan Fraktion vorliegenden  
15 Radioaktivität (z.B. mittels Scintillationszähler) nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane als Substart  
20 benötigt, ein Verfahren, worin das Protein mit alpha-1,4-Glucan phosphorylierender, enzymatischer Aktivität P-Stärke als Substrat verwendet. Besonders bevorzugt handelt es sich um Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*, die nachträglich enzymatisch phosphoryliert wurde. Zur Durchführung dieser bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren wird  
25 dementsprechend in den Verfahrensschritten c) i eine phosphorylierte-Stärke und in Verfahrensschritt c) ii eine nicht-phosphorylierte-Stärke eingesetzt.

Dadurch ist es möglich, Proteine zu identifizieren, welche P-Stärke phosphorylieren. Solche Proteine sind besonders geeignet, um Stärke in pflanzlichen Organismen mittels genetischer Manipulation entsprechender Pflanzen zu modifizieren.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, worin das Protein bei der  
5 Übertragung eines Phosphatrestes auf ein P-alpha-1,4-Glucan als phosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Bevorzugt entsteht das genannte Zwischenprodukt durch Autophosphorylierung des betreffenden Proteins.

Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt durch Protein vermittelte Phosphorylierung von P-alpha-1,4-Glucanen entsteht, kann wie bei Ritte et al. (2002,  
10 PNAS 99, 7166-7171) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein Protein zunächst in Abwesenheit von Glucanen mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  in beta-Phosphat-Position markiertem ATP für 15 bis 45 Minuten,  
15 besonders bevorzugt für 20 bis 40 Minuten und insbesondere besonders bevorzugt für 25 bis 30 Minuten in einem Reaktionsansatz 1 inkubiert. Parallel dazu wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im  
20 Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und für weitere 1 Minute bis 5 Minuten, bevorzugt für 2 bis 5 Minuten und insbesondere bevorzugt für  
25 3 Minuten inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-alpha-1,4-Glucane hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden,  
30 welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische



vorliegenden alpha-1,4-Glucane werden vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen alpha-1,4-Glucane z.B. durch Zentrifugation statt, so befinden sich die alpha-1,4-Glucane des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden.

10 Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem

15 Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von alpha-Glucanen vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie

20 oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich können die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebenen alpha-1,4-Glucane des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach anschließendem Waschen der jeweiligen alpha-1,4-Glucane, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende

25 Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die alpha-1,4-Glucane des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so

30 zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von alpha-Glucanen vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten

Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucane, kein signifikant erhöhtes Signal für mit  $^{33}\text{P}$  markierte alpha-1,4-Glucane aufweisen.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches bevorzugt Phosphatmonoesterbindungen in C-2-Position oder in C-3-Position, besonders bevorzugt in C-3-Position eines Glucosemoleküls eines P-alpha-1,4-Glucans  
10 einführt.

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere im P-alpha-1,4-Glucan von einem Protein oder Proteinextrakt bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein oder Proteinextrakt phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucane wie bei Ritte et al. (2002, PNAS  
15 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu werden durch ein Protein oder einen Proteinextrakt zusätzlich phosphorylierte P-alpha-1,4-Glucane unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt werden die von einem Protein phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucane  
20 mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere im P-alpha-1,4-Glucan phosphoryliert werden.

Proteine der erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das  
25 alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, welche nach Verfahrensschritt b) erhalten wurden, werden in Schritt c) erfindungsgemäßer Verfahren in getrennten Ansätzen enthaltend ATP und P-alpha-1,4-Glucan bzw. ATP und nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan inkubiert. Bevorzugt wird dabei zur  
30 Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren ATP, welches einen markierten Phosphatrest, besonders bevorzugt einen in beta-Position spezifisch markierten

Phosphatrest, insbesondere einen in beta-Position spezifisch, radioaktiv markierten Phosphatrest enthält, eingesetzt.

Die Inkubation von erfindungsgemäß in Lösung gebrachten Proteinen mit ATP und P-alpha-1,4-Glucanen nach Verfahrensschritt c) i bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt c) ii erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigt, findet bevorzugt bei einer Temperatur von 20°C bis 30°C, besonders bevorzugt von 23°C bis 27°C und insbesondere bevorzugt von 24°C bis 26°C statt und wird für eine Dauer von mindestens 15 Minuten, bevorzugt für mindestens 20 Minuten, besonders bevorzugt für mindestens 30 Minuten durchgeführt. Die Menge des eingesetzten ATPs beträgt dabei bevorzugt mindestens 0,05 µM, besonders bevorzugt mindestens 3 µM und insbesondere bevorzugt mindestens 5 µM. Die Konzentration des eingesetzten P-alpha-1,4-Glucans bzw. des eingesetzten nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucans beträgt dabei bevorzugt mindestens 1 mg/ml, besonders bevorzugt mindestens 10 mg/ml und insbesondere bevorzugt mindestens 25 mg/ml. Nach erfolgter Inkubation können die Reaktionen von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen gestoppt werden. Das Stoppen des jeweiligen Reaktionsgemisches kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat und Erhitzen für 5 Minuten auf 95°C erfolgen. Bei der Durchführung von Schritt c) i) bzw. c) ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und P-alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigt, sind bei der Inkubation von Proteinen mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen jeweils gleiche Inkubationsbedingungen für die jeweiligen Inkubationsansätze durchzuführen.

Das nach Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte-alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigt, erhaltene P-alpha-1,4-Glucan nach Verfahrensschritt c) i bzw. das erhaltene nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan nach Verfahrensschritt c) ii wird auf die Einführung von zusätzlichen

Phosphatresten hin untersucht. Zur Feststellung, ob durch die Verfahrensschritte c) i und/oder c) ii zusätzlich Phosphatreste in die betreffenden alpha-1,4-Glucane eingeführt wurden, kann jede Methode verwendet werden, welche zur spezifischen Detektion der verwendeten Markierung des in den Verfahrensschritten c) i und c) ii verwendeten markierten ATPs möglich ist. Wird z.B. radioaktiv markiertes ATP in den Verfahrensschritten c) i bzw. c) ii eingesetzt, so kann dieses mit dem Fachmann bekannten Methoden zur Aufspürung radioaktiver Elemente wie z.B. Autoradiographie, Messung der Radioaktivität mittels geeigneter Geräte (z.B. Scintillationszähler, „Phosphoimager“ etc.) erfolgen.

10

Proteine, eingesetzt in Verfahrensschritt b) erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, die in Schritt c) i signifikante Mengen an Phosphatresten in P-alpha-1,4-Glucane eingeführt haben, jedoch im Vergleich dazu in Schritt c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatresten in nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane eingeführt haben, können mittels dem Fachmann bekannten Methoden identifiziert werden.

Unter dem Begriff „signifikante Mengen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Menge verstanden werden, die mindestens zweifach, bevorzugt mindestens vierfach, besonders bevorzugt mindestens sechsfach und insbesondere bevorzugt mindestens achtfach höher ist, als die in entsprechenden Kontrollexperimenten ermittelte Menge.

Als Kontrollexperimente können hierbei Inkubationsansätze verwendet werden, die statt nativen Proteinextrakten vollständig inaktivierte Proteinextrakte oder keine Proteinextrakte enthalten. Als „vollständig inaktiviert“ sind Proteinextrakte anzusehen, in welchen keine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität mehr nachgewiesen werden kann.

Die Identifizierung von Proteinen bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-

- 1,4-Glucanen aufweist, kann mit Hilfe der Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. der Ermittlung der Aminosäuresequenz der betreffenden Proteine nach Methoden umfassend Edmann-Abbau, der Massenanalyse mittels MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Off Flight-Mass Spectroscopy), gefolgt
- 5 von Vergleichen mit Datenbanken, enthaltend Massenprofile von Proteinen, der Aminosäuresequenzermittlung mittels Q-TOF-Analyse oder TOF/TOF-Analyse etc. erfolgen. Bevorzugt findet die Identifizierung der betreffenden Proteine mittels Q-TOF-MS-MS-Analyse statt, insbesondere bevorzugt werden die Proteine mit Hilfe der weiter unten beschriebenen Methode (siehe Allgemeine Methoden 10) identifiziert.
- 10 Werden Proteine mittels MALDI-TOF-MS, gefolgt von Vergleichen mit Datenbanken, enthaltend Massenprofile von Proteinen, ermittelt, so werden die betreffenden Proteine vorher zunächst enzymatisch verdaut bevor die einzelnen Massen der aus dem Verdau hervorgegangenen Proteinfragmente (Peptide) mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden. Man erhält ein Massenprofil des betreffenden Proteins. Diese
- 15 Massenprofile sind sehr spezifisch für ein Protein, da zum Verdau der Proteine sequenzspezifische Proteasen eingesetzt werden, die nur dann eine Peptidbindung spalten, wenn sie in einer spezifischen Aminosäuresequenzabfolge enthalten ist. Ist die spezifische Aminosäuresequenz, welche als Erkennungssequenz für eine bestimmte Protease dient, bekannt, so kann man von jeder beliebigen
- 20 Aminosäuresequenz ein theoretisches Massenprofil erstellen, indem man die Massen der Peptide berechnet, die nach Verdau der Aminosäuresequenz mit einer spezifischen Protease entstehen würden. Durch Vergleich von tatsächlich mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Massenprofilen unbekannter Proteine mit den theoretisch ermittelten Massenprofilen in entsprechenden Datenbanken, können damit auch
- 25 Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Aminosäuresequenzen enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, werden die

30 durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt a) erhaltenen P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe von den nicht an die betreffenden alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteinen getrennt.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, werden die  
5 nach Schritt b) erfindungsgemäßer Verfahren in Lösung gebrachten Proteine von den in Schritt a) eingesetzten P-alpha-1,4-Glucanen abgetrennt.

In einer weiteren Ausführungsform, erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität  
10 aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, werden die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren nach Verfahrensschritt b) erhaltenen in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine, voneinander getrennt.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren zur  
15 Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, werden die durch Inkubation von Proteinextrakten nach Schritt c) i mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nach Schritt. c) ii mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen erhaltenen Glucane von den im Reaktionsgemisch vorliegenden Proteinen  
20 und/oder dem im Reaktionsgemisch vorliegenden markierten ATP getrennt.

Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der alpha-1,4-Glucane eine Filtration verwendet, besonders bevorzugt eine Zentrifugation, insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet. Nach erfolgter Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens befinden sich  
25 löslichen Substanzen des Reaktionsgemisches im Überstand des Zentrifugationsmediums, während die alpha-1,4-Glucane im sedimentierten Pellt vorliegen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung  
30 eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität

aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt betrifft ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt  
5 von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, werden nach Identifizierung der betreffenden Proteine Aminosäuresequenzen ermittelt, die diese Proteine codieren.

10 Die Ermittlung von Aminosäuresequenzen kann erfindungsgemäß mit dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen. Solche Methoden sind ausreichend in der Fachliteratur beschrieben (z.B. in Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, 2000, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0-471-32249-0; Protein Sequencing Protocols, 2002, Smith (Edt), Edition: 2<sup>ND</sup>, Humana Press, ISBN:  
15 0-89603-975-7) und sind grundsätzlich für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren geeignet. Auch wird von vielen Firmen (z.B. Eurogentec, Searing, Belgien) die Aufreinigung und/oder Sequenzierung von Proteinen als Auftragservice durchgeführt.

Falls notwendig, können Proteine, identifiziert mit einem erfindungsgemäßen  
20 Verfahren zur Identifizierung eines Proteins vor der Ermittlung ihrer Aminosäuresequenz einer weiteren Aufreinigung und/oder Konzentrierung unterzogen werden. Methoden zur Aufreinigung und/oder Konzentrierung von Proteinen sind in der Fachliteratur ausreichend beschrieben (z.B. in Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification, Vol.182 1990, Deutscher, Murray P. (Edt),  
25 Academic Press, ISBN: 0-12-182083-1; Isolation and Purification of Proteins: Hatti-Kaul, 2003, Rajni (Edt); Mattiasson, Bo (Edt), Marcel Dekker Inc, ISBN:0-8247-0726-5,, Protein Purification Techniques: A Practical Approach. Roe, 2001, Simon (Edt). The Practical Approach Series, 244. Edition: 2ND. Oxford Univ Press, ISBN: 0-19-963673-7) und sind grundsätzlich für die Durchführung erfindungsgemäßer  
30 Verfahren geeignet.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dienen erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dessen es codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) aufweist. Vorzugsweise weist  
5 die Phosphohistidindomäne, zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus Arabidopsis thaliana und Oryza sativa eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% auf.

10

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dienen erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dessen es codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) aufweist, wobei die  
15 Phosphohistidindomäne zwei Histidine enthält.

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Proteine identifiziert werden, welche eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen.

20

Daher sind auch Proteine Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, erhältlich sind.

25

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Proteine identifiziert werden, die eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweisen und P-alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.



Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Proteine, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, erhältlich sind.

5

Weiterhin ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin

- 10
- a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,
  - b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden und
  - c) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Aminosäuren identifiziert werden, die ein nach Schritt a) identifiziertes Protein codieren.

15

Die Aminosäuresequenz der mit einem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine kann wie oben bereits ausgeführt, mit Hilfe dem Fachmann bekannten Methoden ermittelt werden.

- 20
- Basierend auf den nach Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, ermittelten Aminosäuresequenzen können Nucleinsäuren identifiziert werden, die ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist,
- 25
- codieren.

- Die Identifizierung von Nucleinsäuren, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist kann z.B. mittels Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL
- 30
- (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology

Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, erfolgen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Aminosäuresequenzen, ermittelt bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen

5 Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for  
10 Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low compexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11,  
15 Extension = 1.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren ermittelten Aminosäuresequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren, die ein Protein, welches eine alpha-1,4-  
20 Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, Nucleinsäuremoleküle und/oder Aminosäuresequenzen zu identifizieren, welche zu Nucleinsäuremolekülen und/oder Proteinen, erhältlich mit erfindungsgemäßen Verfahren, einen hohen Grad an Identität aufweisen und ein Protein codieren, welches eine alpha-1,4-Glucan  
25 phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist.

Dem Fachmann sind Methoden bekannt, mit welchen er ausgehend von Aminosäuresequenzen für diese codierende Nucleinsäuren identifizieren kann (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold  
30 Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929). Von Aminosäuresequenzen, codierend ein Protein,

welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, können entsprechend dem genetischen Code Nucleinsäuren abgeleitet werden, welche die betreffenden Aminosäuresequenzen codieren. Dem Fachmann ist bekannt, dass die zur Identifizierung von Nucleinsäuren grundsätzlich auch  
5 entsprechend dem genetischen Code degenerierte Oligonucleotide verwendet werden können. Anschließend können Oligonucleotide synthetisiert werden, die von den Aminosäuresequenzen, erhalten bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, abgeleitete Sequenzen darstellen. Mit Hilfe dieser synthetischen Oligonucleotide können Nucleinsäuren identifiziert werden, die Proteine, von deren  
10 Aminosäuresequenz die entsprechenden Oligonucleotidsequenzen abgeleitet wurden, codieren. Diese kann z.B. mittels Durchmusterung von Genbanken, wobei die genannten synthetischen Oligonucleotide als markierte Sonden in Form von Hybridisierungsprobe (-sonde) eingesetzt werden geschehen. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Nucleinsäuren, codierend ein Protein, welches  
15 eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, ist die Verwendung der synthetischen Oligonucleotide, abgeleitet von Aminosäuresequenzen, erhalten bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, mittels Durchmusterung von Genbanken mit Hilfe PCR basierter Verfahren, worin die genannten synthetischen Oligonucleotide als so genannte  
20 „Primer“ verwendet werden. Genbanken können z.B. in Form von Cosmiden, Phagmiden, Plasmiden, YACs oder BACs vorliegen. Die DNA-Bibliotheken können sowohl genomische, als auch cDNA enthalten. Für PCR basierte Durchmusterungsverfahren ist bei Verwendung der so genannten RT-(Reverse Transcription) PCR auch die Verwendung von mRNA möglich. Die für die  
25 Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure in Genbanken oder als mRNA vorliegenden Nucleinsäuren können dabei aus jedem Organismus stammen, bevorzugt stammen sie aus eukaryontischen, besonders bevorzugt aus pflanzlichen Organismen, insbesondere bevorzugt aus Cerealien.

30 Es ist für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, nicht notwendig, dass in Schritt b) der erfindungsgemäßen Verfahren die gesamte das betreffende Protein

codierende Aminosäuresequenz ermittelt wird, sondern es kann ausreichend sein, wenn nur Teile der betreffenden Aminosäuresequenzen, die ein betreffendes Protein codieren, ermittelt werden.

- 5 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin
- a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,
- 10 b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden,
- c) Ausgehend von den in Schritt b) ermittelten Aminosäuresequenzen Oligonucleotide synthetisiert werden und
  - d) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt c) synthetisierten Oligonucleotide
- 15 identifiziert werden, die ein nach Schritt a) identifiziertes Protein codieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin

- 20 a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,
- b) Antikörper, die spezifisch mit dem nach Schritt a) identifizierten Protein reagieren, hergestellt werden und
  - c) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Antikörper identifiziert
- 25 werden.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik,

Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten.

- 5 Methoden zur Identifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe von Antikörpern, in der Fachliteratur oft als „Immunoscreening“ bezeichnete Verfahren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad. Verlag., Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Zur Durchführung solcher Verfahren können z.B. so genannte
- 10 Expressions-Genbanken verwendet werden, bei welchen die enthaltenen Klone auf die Expression eines bestimmten Proteins mit Hilfe eines gegen dieses Protein gerichteten spezifischen Antikörpers hin durchmustert werden. Materialien zur Herstellung solcher Expressions-Genbanken, enthaltend auch Anleitungen betreffend Verfahren zur Herstellung, als auch Verfahren zur Durchmusterung
- 15 solcher Expressions-Genbanken sind käuflich erwerbbar (z.B. Stratagene).

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Nucleinsäuren identifiziert werden, welche Proteine codieren, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen

20 und/oder die eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweisen und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.

Daher sind auch Nucleinsäuren Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein

25 Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt erhältlich sind.

Ein Plasmid (A.t.-OK1-pGEM), enthaltend eine cDNA, die ein erfindungsgemäßes Protein (A.t.-OK1) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde am 08.03.2004 unter der

30 Nummer DSM16264 und ein Plasmid (pMI50), enthaltend eine cDNA, die weiteres erfindungsgemäßes Protein (O.s.-OK1) aus *Oryza sativa* codiert, wurde am

24.03.2004 unter der Nummer DSM16302 nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland.

- 5 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass genetisch modifizierte Pflanzenzellen oder Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat bzw. der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke  
10 besser geeignet ist.

- Daher betrifft ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen oder genetisch modifizierte Pflanzen, dadurch  
15 gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte enzymatische Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

- Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu  
20 einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines erfindungsgemäßen Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

- Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden  
25 Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer  
5 erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen  
10 gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

15

Der Begriff "erhöhte Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die .erfindungsgemäße Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an erfindungsgemäßen Proteinen in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität erfindungsgemäßer  
20 Proteinen in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an erfindungsgemäße Proteine codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Vorzugsweise werden hierbei zur Bestimmung  
25 einer erhöhten Expression erfindungsgemäßer Proteine Nucleinsäuremoleküle verwendet, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure identifiziert wurden. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens  
30 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein erfindungsgemäßes Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen, die keine nachweisbaren Transkripte,

codierend ein erfindungsgemäßes Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge an Transkripten, codierend ein erfindungsgemäßes Protein, aufweisen.

- 5 Die Erhöhung der Menge an Protein eines erfindungsgemäßen Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Die Herstellung eines Antikörpers, der zur Messung der
- 10 Erhöhung der Menge an Protein mittels immunologischer Methoden verwendet werden kann ist beispielhaft weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 11). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge eines erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%,
- 15 bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge eines erfindungsgemäßen Proteins bedeutet auch, dass Pflanzen, die keine nachweisbare Menge eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen.

20

- Es wurde überraschenderweise ebenfalls gefunden, dass genetisch modifizierte Pflanzenzellen oder Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere betreffend die Phosphatverteilung im
- 25 Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

- Daher betrifft ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen oder genetisch modifizierte Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine verringerte enzymatische Aktivität eines
- 30 erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.



Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, weisen einen Hoch Stärke (starch excess) Phänotyp auf. Weiterhin zeigen Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen ein normales Wachstum, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, d.h. die Pflanzen werden  
5 durch die verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins nicht in ihrem Wachstum behindert. Daher eignen sich Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen für die Kultivierung in der Landwirtschaft, da sie mehr Stärke und damit mehr Kohlenhydrate enthalten und gleichzeitig keine Verringerung Wachstumsrate zeigen.

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen, die einen Hoch Stärke Phänotyp aufweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen weisen in ihren Blättern am Ende der Dunkelphase mindestens zweimal, bevorzugt mindestens viermal, besonders bevorzugt mindestens sechsmal und insbesondere bevorzugt mindestens achtmal  
15 mehr Stärke auf, als entsprechende Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen weisen in ihren Blättern am Ende der Lichtphase mindestens 1,2 mal, bevorzugt mindestens 1,5 mal, besonders bevorzugt mindestens 1,8 mal und insbesondere bevorzugt mindestens zweimal mehr Stärke auf, als entsprechende Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-  
20 Pflanzen.

- Die Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Verfahren erzielt werden. Hierzu  
25 zählen beispielsweise die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, oder eines doppelsträngigen RNA Konstruktes, die Bereitstellung von Molekülen oder Vektoren, die einen Cosuppressionseffekt vermitteln, die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren, oder die so genannte "in vivo-Mutagenese".  
30 Ferner kann die Verringerung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins in Pflanzenzellen und Pflanzen auch durch die simultane Expression von sense und

antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des OK1 Gens, hervorgerufen werden.

Darüberhinaus ist bekannt, dass *in planta* die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotorsequenzen *in trans* zu einer Methylierung und einer  
5 transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieses Promotors führen kann (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

Eine weitere Möglichkeit die enzymatische Aktivität von Proteinen in Pflanzenzellen oder Pflanzen zu verringern, ist die Methode der so genannten Immunomodulation. Es ist bekannt, dass eine *in planta* Expression von Antikörpern, die ein pflanzliches  
10 Protein spezifisch erkennen, durch Ausbildung eines Protein Antikörper Komplexes eine Verringerung der Aktivität betreffender Proteine in entsprechenden Pflanzenzellen zur Folge hat (Conrad und Manteufel, Trends in Plant Science 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., Plant Molecular Biology 43, (2000), 419-428; Jobling et al., Nature Biotechnology 21, (2003), 77-80).

15 Alle diese Verfahren basieren auf der Einführung eines fremden oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzen und sind daher grundsätzlich geeignet, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen herzustellen.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen um Pflanzenzellen von Stärke speichernden Pflanzen bzw. um Stärke speichernde Pflanzen. Stärke speichernde Pflanzen sind z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süßkartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse,  
25 *Arabidopsis*, Curcuma oder Sorghum Pflanzen. Besonders bevorzugt sind Reis-, insbesondere bevorzugt Weizen Pflanzen.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße  
30 genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes

5 Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung oder Verringerung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression des fremden

10 Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des

15 eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung oder Verringerung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins.

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in

20 entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren

25 Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins bewirkt.

30

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden

werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

- 5 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes Protein codiert.
- 10 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht und wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes
- 15 Nucleinsäuremolekül, bevorzugt ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, isoliert aus *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt isoliert aus Reis umfasst.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher

20 Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen

25 ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33.).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf Agrobakterium Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May  
5 et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24,  
10 (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-  
15 844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297).  
20 Alle vorstehenden Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das  
25 natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich  
30 derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-

Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen

5 bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen).

10 Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die

15 Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen

20 Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen,

25 zeigen bei der Untersuchung mittels genannter immunologischer Methoden eine verringerte Menge des betreffenden Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die

30 erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise

Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In einer speziellen Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen  
5 Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, eine modifizierte  
10 Stärke im Vergleich zu Stärke, isoliert aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke veränderte physico-chemische Eigenschaften gegenüber  
15 nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die  
20 einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens  
25 synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes C-3/C-6-Verhältnis des Stärkephosphates aufweist im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-  
30 3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem

Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu entsprechenden Stärken, isoliert aus nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Pflanzen.

- 5 Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von alpha-1,4-Glucanen verstanden werden.

- 10 Unter dem Begriff „C-2/C-3/C-6-Verhältnis“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-2-Position, C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu dem Gesamtgehalt des Stärkephosphates des betreffenden alpha-1,4-Glucans (C-2-Position + C-3-Position + C-6-Position) beiträgt.

- 15 Unter dem Begriff „C-3/C-6-Verhältnis“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu der Summe aus dem in C-3-Position und in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) des betreffenden alpha-1,4-Glucans  
20 beiträgt.

- Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie  
25 einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat in C-3-Position der Glucosemoleküle aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Pflanzen, enthaltend  
30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen.



### Beschreibung der Sequenzen

- SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des A.t.-  
5 OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-T und OK1-pDEST™17 und inseriert.
- SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- 10 SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.
- SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- 15 SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* und *Sorghum bicolor*.
- SEQ ID NO 6: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.
- SEQ ID NO 7: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend  
20 ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.
- SEQ ID NO 8: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.
- SEQ ID NO 9: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 6, SEQ  
25 ID NO 7 und SEQ ID NO 8 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.
- SEQ ID NO 10: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 9 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 11: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 12: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

5 SEQ ID NO 13: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 14: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

10 SEQ ID NO 15: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

15 SEQ ID NO 16: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 15 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 17: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

SEQ ID NO 18: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

20 SEQ ID NO 19: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

SEQ ID NO 20: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

25 SEQ ID NO 21: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 und SEQ ID NO 20 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

30 SEQ ID NO 22: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 21 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 23: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen.

SEQ ID NO 24: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen.

- 5 SEQ ID NO 25: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 23 und SEQ ID NO 24 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

- 10 SEQ ID NO 26: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 25 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

### Beschreibung der Abbildungen

- 15 Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind  
20 Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein  
25 phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

- Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes  
30 (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden

(SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

10 Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht  
15 Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B)  
20 eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit  
25 Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. ). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die  
30 erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit

Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP oder randomisiertes  $^{33}\text{P}$  ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

## Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die

vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

5

## **1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Gewebe**

### **a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben**

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte  
10 Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis  
15 abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

### **b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine**

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und  
20 sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren  
25 inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

### **c) Entsalzen der ausgefällten Proteine**

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule  
30 (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex

G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal  
 5 jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

10 Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254).

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
15	1 mM	EDTA
	2 mM	Dithioerythritol (DTE)
	2 mM	Benzamidin
	2 mM	ε-Aminocaprinsäure
	0.5 mM	PMSF
20	0.02 %	Triton X-100

## 2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert  
 25 und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ ) gegeben. Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

20

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke



Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

- 5 Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen
- 10 Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer
- 15 linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

- Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert
- 20 werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

25 g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0  
0.2 mM EDTA  
0.5 % Triton X-100

- 30 Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

### **3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

5 Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges  
10 verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen  
15 bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag  
20 besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke  
25 phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren  
30 zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann

bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

- 5 Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-  
10 Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende  
15 Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

- Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur  
20 Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur  
25 Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD<sub>600</sub>) von ca. 0,8 inkubiert.

- Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein  
30 Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B.

der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

#### 4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

##### 10 a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen

Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

##### b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt

- dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in
- 5 voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufrieden stellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.
- 10 Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

15 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

20 1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

25 300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

5 Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazol  
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante

## 6. Reinigung eines R1 Proteins

## 7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

a) *In vitro* Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschritte finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschritt erfolgt eine Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

15 b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	6 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	ATP

20

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke**

25 a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit

30

Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach  
 5 Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inklusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je  
 10 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

15

b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-  
 20 Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-  
 25 phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

30 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

6 % SDS



30 %            Glycerin  
~ 0,015 %    Bromphenolblau  
60 mM            DTE (frisch zusetzen!)

- 5 Percoll:        Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

**9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden**

- 10 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-
- 15 phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

20

**10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen**

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

- 25 Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-

phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

b) Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

- 10 Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer
- 15 dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau
- 20 erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine
- 25 verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von
- 30 Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt

eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist allein auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5  $\mu\text{l}$  bis 10  $\mu\text{l}$ ) aufgenommen und in ca. 0,5  $\mu\text{l}$  Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix ( $\epsilon$ -Cyano-4-hydroxymizsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker Reflex<sup>TM</sup> II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucose binden und/oder P-alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigen.

25

## 11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01  $\mu\text{g}$  bis 5,0  $\mu\text{g}$  pro

mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden

5 Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.

- 10 Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

15

- b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf das Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige

20 Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) analysiert.

- 25 c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden

Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-

30 Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert

werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

- 5    Phosphorylierungs-Puffer: 50 mM        HEPES/KOH, pH 7,5
- 1 mM        EDTA
- 6 mM        MgCl<sub>2</sub>
- 0,01 bis 0,5 mM    ATP
- 10    0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes <sup>33</sup>P-ATP (alternativ  
kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen  
spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest  
enthält)

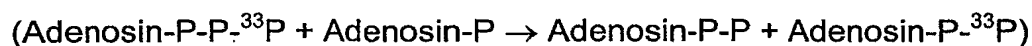
Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden

15    Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in  
beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-  
7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als  
Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem  
ATP ist im Folgenden beschrieben.

20    i)    Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe  
von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu  
Grunde:

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:



(Adenosin-P-P + Adenosin-P-<sup>33</sup>P + 2 PEP → Adenosin-P-P-P + Adenosin-P-<sup>33</sup>P-P + 2 Pyruvat)

Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils β<sup>33</sup>P-ATP und etwas γ<sup>33</sup>P-ATP.

5

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100 µCi, 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit <sup>33</sup>P markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 µCi/µl), wird mit 2 µl Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 µl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

15

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

25

Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

30 iv) Verwendete Puffer

Pyruvatkinasepuffer:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
	1 mM	EDTA

Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
------------------------	--------	------------------

5	1 mM	EDTA
---	------	------

	10 %	Glycerol
--	------	----------

	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
--	------	-------------------

	5 mM	KCl
--	------	-----

	0,1 mM	ATP
--	--------	-----

10	0,3 mM	AMP
----	--------	-----

## 12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden.

- 15 Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender
- 20 Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

**13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden**

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

10

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

20 Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

25

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP, etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B. Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca.

30



0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10  
 5 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

10		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
	Stop des Laufes		

15

Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards  
 20 zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen  
 25 Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-  
 30 Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

Eluent C: 100 mM NaOH

Eluent D: 100 mM NaOH

5 500 mM Natriumacetat

**14. Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung mittels Q-TOF-MS-MS**

a) Allgemeines

Isolierte Proteine, die auch in Form von aus Polyacrylamidgelen ausgeschnittenen  
10 Banden vorliegen können, werden zunächst mittels eines Trypsinverdaus in kleinere  
Fragmente gespalten. Die entstandenen Peptide werden in ein  
Hybridmassenspektrometer, bei dem ein Flugzeitmassenspektrometer (Time-of-  
flight-, TOF) an ein Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt ist, aufgebracht. In  
der ersten Phase des Messens ist das erste Massenspektrometer (das Quadrupol)  
15 „ausgeschaltet“ und die Massen der im Verdau entstandenen Peptide können im  
TOF-Massenspektrometer gemessen werden. In der zweiten Phase wird ein  
ausgewähltes Peptid im Quadrupol „ausgefiltert“, d.h. nur dieses Peptid kann das  
Quadrupol passieren, alle anderen werden abgelenkt. Das Peptid wird anschließend  
in der „Stoßzelle“ durch Zusammenstoßen mit geladenen Gasmolekülen zerbrochen.  
20 Die „Brüche“ treten dabei hauptsächlich an den Peptidbindungen auf. Dadurch  
entstehen mehr oder weniger statistisch verteilte Peptidbruchstücke, die sich in der  
Masse unterscheiden. Durch „Sortieren“ dieser Bruchstücke kann dann die  
Aminosäuresequenz der Peptide bestimmt werden. Erhält man sich überlappende  
Peptide, so kann daher auch die Aminosäuresequenz eines Proteins bestimmt  
25 werden. Die Verwendung von Massenspektroskopie zur Identifizierung und  
Sequenzierung ist dem Fachmann bekannt und ausreichend in der Fachliteratur  
beschrieben [z.B. P. Michael Conn (Ed.), 2003, Humana Press, New Jersey, ISBN:  
1-58829-340-8]; J.R. Chapman (Ed.), 2000, Humana Press, SBN: 089603609X].

30 b) Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten von Proteinen

Die Cysteinreste enthaltend in den Aminosäuresequenzen der zu analysierenden Proteine können bereits vor der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese reduziert/alkyliert werden. Dazu werden die Proteine, welche mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden sollen, mit SDS-Probenpuffer (darf kein DTT

5 oder beta-Mercaptoethanol enthalten) versetzt. Anschließend wird diesen Proben frisch angesetztes DTT bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und die Probe für 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur erfolgt die Zugabe von frisch angesetztem Jodacetamid bis zu einer Endkonzentration von 20 mM. Die Probe wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur im

10 Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die in den Proben vorliegenden Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

c) Isolierung der Proteine aus dem Acrylamidgel

Proteinbanden, die Proteine enthalten, dessen Sequenz ermittelt werden sollen,

15 werden mit einem sauberen Skalpell möglichst „randlos“ ausgeschnitten und zerkleinert (ca. 1 mm<sup>3</sup>-Würfel). Die zerkleinerten Gelstücke werden in ein 0,5 ml oder 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und durch kurze Zentrifugation sedimentiert.

d) Entfärben der ausgeschnittenen Gelstücke

20 Wurden mittels Silberionen gefärbte Gele verwendet, so werden die nach Schritt c) erhaltenen Gelstücke mit einer Lösung enthaltend 30 mM K-Ferricyanid und 100 mM Na-Thiosulfat im Verhältnis 1:1 vollständig bedeckt und solange geschüttelt (Vortex), bis die Gelstücke vollständig entfärbt sind. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und die Gelstücke werden je dreimal mit je 200 µl

25 Reinstwasser (Leitfähigkeit ca. 18 MOhm) gewaschen.

Wurden mittels Comassie Blau gefärbte Gele verwendet, so werden die nach Schritt c) erhaltenen Gelstücke mit einer Lösung enthaltend Reinstwasser und Acetonitril (Reinheitsgrad: mindestens HPLC rein) im Verhältnis 1:1 je zweimal für 15 Minuten unter Schütteln inkubiert. Das Volumen der Entfärbelösung sollte ca. dem

30 zweifachen Volumen des Gels entsprechen. Die Waschlösung wird nach jedem Waschschrift abgenommen.

Nach erfolgter Entfärbung werden die Gelstücke mit einem Volumen (bezogen auf die Gelstücke) Acetonitril versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Das Acetonitril wird abgenommen und die Gelstücke mit einem Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei

5 Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von Acetonitril, so dass sich ein Verhältnis von 1:1 bezogen auf die Menge vom Ammoniumbicarbonat und Acetonitril, einstellt. Es wird für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Lösung abgenommen wird und die verbleibenden Gelstücke unter Vakuum getrocknet werden (z.B. Speedvac).

10

e) Trypsinverdau der Proteine in den Gelstücken

Zu den trockenen Gelstücken, erhalten nach Schritt d), wird Trypsinlösung (10 ng Trypsin pro  $\mu\text{l}$  50 mM Ammoniumbicarbonat) in 10  $\mu\text{l}$  Portionen zugeben. Nach jeder Zugabe von Trypsinlösung erfolgt eine Inkubation auf Eis für jeweils 10 Minuten. Es

15 wird solange portionsweise Trypsinlösung hinzu gegeben, bis die Gelstücke nicht weiter quellen und von Trypsinlösung vollständig bedeckt sind. Anschließend wird die Trypsinlösung entfernt und die Gelstücke über Nacht bei 37°C inkubiert.

f) Isolierung der Peptide aus dem Acrylamidgel

20 Die nach Schritt e) erhaltenen Proben werden kurz zentrifugiert, um die im Reaktionsgefäß enthaltene Flüssigkeit zu sammeln, die Flüssigkeit wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke werden für 2 Minuten mit Ultraschall behandelt (Ultraschallwasserbad). Anschließend werden die zurückbleibenden Gelstücke mit dem einfachen ihres Volumens 25 mM

25 Ammoniumbicarbonatlösung versetzt und für 20 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird Acetonitril hinzu gegeben, so dass sich ein Verhältnis von Ammoniumbicarbonat zu Acetonitril von 1:1 einstellt und unter Schütteln bei Raumtemperatur für weiter 15 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben erneut für 2 Minuten mit Ultraschall behandelt, bevor die Flüssigkeit

30 abgenommen und mit der zuvor abgenommenen Flüssigkeit vereinigt wird. Die verbleibenden Gelstücke werden mit dem einfachen ihres Volumens einer Lösung enthaltend 5% Ameisensäure und Acetonitril im Verhältnis 1:1 versetzt und für 15

Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wird abgenommen und mit den zuvor abgenommenen Flüssigkeiten vereint. Die Inkubation der Gelstücke in 5% Ameisensäure / Acetonitril (Verhältnis 1:1) wird wiederholt und die erhaltene Flüssigkeit ebenfalls zu den vorher gesammelten Flüssigkeiten gegeben. Die vereinigten Überstände enthalten die zu sequenzierenden Peptide und werden in der Vakuumzentrifuge (Speedvac) bei 60°C auf ca. 15 µl eingeeengt. Die so erhaltenen Peptide können bei 20°C bis zur Analyse mittels Q-TOF gelagert werden. Bevor die Proteine in der Massenanalyse sequenziert werden können sie nach dem Fachmann bekannten Methoden entsalzt werden.

#### **15. Transformation von Reispflanzen**

Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

#### **16. Transformation von Kartoffelpflanzen**

Kartoffelpflanzen wurden mit Hilfe von Agrobakterium, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, transferiert.

#### **20 17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat**

##### **a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes**

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7 µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-

Phosphat Dehydrogenase (von *Leuconostoc mesenteroides*, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

5 b) Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit  
10 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

15 c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-  
20 Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Auftrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten  
25 werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

## Beispiele

1. **Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist**

- 5 a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*

Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (Frischgewicht) von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.

- 10 b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.

15

- c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein

Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden

- 20 beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

- 25 d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke

nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren  
5 inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

10 In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

15 e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und  
20 anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

25

f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie  
30 unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt.



Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html); ProFound: [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe); PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch  
5 verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der  
10 Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519  
15 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

## **2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert**

20 Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA, isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod.  
25 Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM®-T bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der  
30 Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz, codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

5 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf  
10 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1<sup>st</sup> Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

15 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

20 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

25 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur

des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen. Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde  
5 die Reaktion auf 4°C gekühlt.

### **3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins**

Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM®-T als  
10 Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-  
15 pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide, die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon  
20 (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren, codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem  
25 Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

### **4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in E. coli**

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert.  
30 Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone,

enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

## **5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins**

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

## **6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins**

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (<sup>33</sup>P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

5

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, 10  
15  
signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substart benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substart von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit <sup>33</sup>P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta- 20  
Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

## 7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu

bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der

5 Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die

10 bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der

15 Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification,

20 Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP inkubiert, so kann keine

25 Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem

30 ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der

Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

## 8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

### a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils <sup>33</sup>P markiertes ATP (ca. 2,5 x 10<sup>6</sup> cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl



b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und  
 5 anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines  
 10 Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die  
 15 Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H<sub>2</sub>O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert.  
 20 Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

25	Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
	Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels  
 30 HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben

zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERT<sup>TM</sup>) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:

Gesamt cpm je Fraktion			
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)	B
Fr 13	8,7	3,3	
Fr 14	13,1	32,2	
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8	
Fr 16	399,8	112,3	
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6	
Fr 18	196,7	17,3	
Fr 19	6,7	18,9	
Summe	2581,5	2938,3	
Auftrag	3000,0	3000,0	
Wiederfindung	86,0%	97,9%	

**Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der

10 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat

15 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während

von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

## 9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

- 5 Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt. Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein
- 10 benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz
- 15 codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-OK1 Protein auf.

- 20 Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

- 25 Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os\_ok1-F6 (AAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von
- 30 unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den

Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der

5 Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os\_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120  
10 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

Os\_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os\_ok1-R7  
15 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ  
20 DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

Os\_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os\_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
25 Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML119 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

Os\_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os\_ok1-R2  
30 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen

Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.

Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen:

- 5 Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

- 10 Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os\_ok1-F4 (s. o.) und Os\_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os\_ok1-F6 und Os\_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

- 15 Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *Xho*I-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os\_ok1-F3 (s. o.) und Os\_ok1-R2Xho (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

- 20 Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Pst*II erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

- 25 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Xho*I aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

- 30 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Afl*II/*Not*I aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit  
5 pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

#### 10. Identifizierung weiterer OK1 Proteine aus verschiedenen Pflanzenspezies

- Mit Hilfe der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen  
10 Verfahren konnten auch Proteine in Gerste (*Hordeum vulgare*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Hirse (*Sorghum bicolor*) identifiziert werden, welche einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke übertragen. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von diesen Proteinen nicht als Substrat verwendet, d.h. diese Proteine benötigen P-Stärke als Substrat.
- 15 Die Proteine wurden nach dem unter Punkt 14, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert, mit Trypsin verdaut, aus dem Gel herausgelöst und mittels Q-TOF-MS-MS sequenziert. Mit den erhaltenen Peptidsequenzen konnten durch Datenbankvergleiche (blast searches) EST Nucleinsäuresequenzen ermittelt werden, die die betreffenden OK1 Proteine aus Gerste, Kartoffel, Weizen bzw. Hirse  
20 codieren.

Die in SEQ ID NO 9 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Gerste und wurde unter der „Accession“ Nr.: TC117610 in der TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 und SEQ ID NO 8 sind diejenigen  
25 Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Gerste isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 9 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 10 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Gerste und kann von der in SEQ ID NO 10 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet  
30 werden.

Die in SEQ ID NO 15 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Kartoffel und wurde unter der „Accession“ Nr.: BF054632 in der TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Kartoffel isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 15 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 16 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Kartoffel und kann von der in SEQ ID NO 15 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Die in SEQ ID NO 21 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Hirse und wurde unter der „Accession“ Nr.: TC77219 in der TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 und SEQ ID NO 20 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Hirse isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 21 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 22 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Hirse und kann von der in SEQ ID NO 21 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Die in SEQ ID NO 25 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Weizen und wurde unter der „Accession“ Nr.: CA741319 in der TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 23 und SEQ ID NO 24 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Weizen isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 25 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 26 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Weizen und kann von der in SEQ ID NO 25 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Um die Datenbankvergleiche durchzuführen wurden folgende Einstellungen gewählt:

Program: tblastn



Matrix:        blosum62  
Expect:        100  
Echofilter:    disabled  
Descriptions: 20

5    Alle anderen Einstellungen lauteten „default“.

### **11. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt**

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein  
10 ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa  
15 keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche  
20 wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

### **12. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte oder eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

#### **a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1**

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis  
25 durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C,  
4 mM Mg2SO4) mit den Primern glb1-F2  
(AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1  
(AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer

11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1

5 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2

(AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

10 Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene  
15 Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären  
20 Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

25 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und  
30 Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-ok1-pGEM-T herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-ok1-pGEM-T mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl136II* und *XhoI* geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

b) Herstellung eines Konstruktes zur Inhibierung des OK1 Proteins in Reis mittels RNAi Technologie

Das Plasmid pML125, welches zur Transformation von Reispflanzen verwendet wurde, wurde durch spezifische Rekombination der Plasmide pML124 und pIR115 unter Verwendung des Gateway<sup>TM</sup> Klonierungssystems (Invitrogen) erhalten.

pML124 wurde erhalten, indem ein 359 Basenpaare langes DNA-Fragment aus pML119 (siehe oben, Beispiel 9), enthaltend einen Teil des offenen Leserasters welcher für das ok1-Protein aus Reis codiert, in den mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pENTR-1A (Invitrogen, Produktnummer 11813-011) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR87 wurde erhalten indem das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais mit den Primern Adh(i)-1 (TTTTCTCGAGGTCCGCCTTGTTTCTCCT) und Adh(i)-2 (TTTTCTCGAGCTGCACGGGTCCAGGA) auf genomischer DNA von Mais amplifiziert wurde. Das Produkt der Polymerase Kettenreaktion (30 x 30 sec 94 °C, 30 sec 59 °C, 1 min 72 °C, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut und

in den Vektor pBluescript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert, der mit dem gleichen Enzym geschnitten worden war.

In den Vektor pIR96 wurde ein 986 Basenpaare langes DNA Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert. Das erhaltene

5 Plasmid wurde mit pIR103 bezeichnet.

Das Plasmid pIR107 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnittene Plasmid pIR103 kloniert wurde.

10 Aus dem Plasmid pIR87 wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* ein 540 Basenpaare langes Fragment enthaltend das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *XhoI* geschnittene Plasmid pIR107 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR114 bezeichnet. Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit *Ecl136II* geschnittene Plasmid pIR114 kloniert wurde.

#### 15 c) Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend entweder das Plasmid pGlo-A.t.-OK1 oder das Plasmid pML125) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

#### 20 d) Analyse der transgenen Reispflanzen, die das A.t.-OK1 Protein exprimierten und der von diesen Pflanzen synthetisierten Stärke

Es konnten mittels Northern Blot Analyse mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1 transformierte Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression des heterologen A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

25 Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, aus diesen, Körnern, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphaat.

- e) Analyse der transgenen Reispflanzen, bei welchen die Expression des endogenen OK1 Proteins mittels RNAi Technologie reprimiert wurde und der von diesen Pflanzen synthetisierten Stärke

Mittels Northern Blot Analyse konnten Reispflanzen identifiziert werden, die mit dem  
5 Plasmid pML125 transformiert waren und eine verringerte Expression der endogenen mRNA, codierend das OK1 Protein aufwiesen.

### **13. Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine erhöhte oder eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

- 10 a) Herstellung des Plasmides pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das *EcoRI-HindIII*-Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBIB-Hyg ligiert (Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203).

- 15 Das Plasmid pBinB33 wurde erhalten, indem der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) als *DraI*-Fragment (Nukleotide – 1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert wurde. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und  
20 *SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

- b) Herstellung des Vektors A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

- 25 Die codierende Sequenz des A.t.-OK1 Proteins wurde mit den Restriktionsendonucleasen Bsp120I und Sall aus dem Plasmid OK1-pGEM-T herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und Sall geschnittenen Vektor pBinB33-Hyg ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit A.t.-OK1-pBinB33-Hyg bezeichnet.

- 30 c) Transformation von Kartoffelpflanzen

*Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV2260) wurde mit dem Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg transformiert. Anschließend wurden Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée mit Hilfe von Agrobakterien, enthaltend das Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg nach der bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschriebenen Methode transformiert und Pflanzen regeneriert.

d) Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Es konnten mittels Western Blot Analyse sowohl Pflanzen identifiziert werden, die eine erhöhte Aktivität des heterolog exprimierten A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, als auch Pflanzen, bei welchen durch einen Cosuppressionseffekt die Aktivität des endogenen OK1 Proteins verringert war. Die Western Blot Analyse wurde mit dem unter Beispiel 11 beschriebenen Antikörper durchgeführt.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Menge an A.t.-OK1 Protein aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Stärke, die aus Knollen dieser Pflanzen isoliert wurde, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen

#### 14. Analyse von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen

T-DNA Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* (erhältlich von Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/> unter den ACC. No.: Salk\_110814, Alias N610814), die bezüglich der Insertion im OK1 Gen homozygot waren, wurden unter folgenden Bedingungen angezogen:

Lichtphase: 16 Stunden, 20°C

Dunkelphase: 8 Stunden, 16°C

Kurz bevor die Blütenbildung einsetzte, wurden die Pflanzen bei einer Lichtphase von 12 Stunden bei 20°C und einer Dunkelphase von 12 Stunden bei 17°C kultiviert.

Von den erhaltenen Samen der Mutantenlinie (Salk\_110814) wurden Pflanzen aus 3 verschiedenen Samen des ursprünglichen Saatgutes (Salk\_110814-1, Salk\_110814-2, Salk\_110814-3) für die Analyse kultiviert.

Am Ende der Dunkelphase wurden von 6 Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Columbia) jeweils 10 Blätter entfernt und in 70% Ethanol bei 50°C entfärbt. Weiterhin wurden von jeweils 4 verschiedenen Pflanzen der Mutantenlinien Salk\_110814-1, Salk\_110814-2 bzw. Salk\_110814-3 die jeweils homozygot bezüglich der T-DNA Insertion in einem OK1 Gen waren, jeweils 6 Blätter entfernt und in 70% Ethanol bei 50°C entfärbt. Anschließend wurden die Blätter für 10 Minuten in Lugol'scher Lösung inkubiert, bevor überschüssige Lugol'sche Lösung mit Leitungswasser von den Blättern abgespült wurde. Alle Blätter von Wildtyp-Pflanzen zeigten keine Färbung mit Lugol'scher Lösung. Alle Blätter der Mutantenlinien Salk\_110814-1, Salk\_110814-2 bzw. Salk\_110814-3 zeigten hingegen eine dunkelbraune oder eine schwarze Färbung (siehe Fig. 7). Die Mutantenlinien zeigen daher einen Hoch-Stärke Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen. Während der Kultivierung konnten keine Unterschiede betreffend das Wachstum zwischen den Mutantenlinien und den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden.

Genetisch modifizierte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, welche mit einem RNAi Konstrukt, enthaltend „inverted Repeats“ der codierenden Region eines OK1 Gens unter Kontrolle des 35S Promotors, transformiert waren, wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse unter Verwendung des in Beispiel 10 beschriebenen Antikörpers analysiert. Es konnten mehrere unabhängige Linien identifiziert werden, die eine verringerte Menge an OK1 Protein aufwiesen, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Diese Linien wurden unter oben angegebenen Kulturbedingungen kultiviert. Jeweils 5 Blätter der einzelnen Linien wurden am Ende der Dunkelphase (12 Stunden bei 17°C) entfernt, in Ethanol entfärbt und mit Lugol'scher Lösung gefärbt. Alle Pflanzen zeigten im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen einen Hoch-Stärke Phänotyp. Während der Kultivierung konnten keine Unterschiede betreffend das Wachstum zwischen den genetisch modifizierten Pflanzen und den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden. Die mittels RNAi Technologie genetisch modifizierten Pflanzen zeigten damit die gleichen Eigenschaften wie die Mutantenlinien Salk\_110814-1, Salk\_110814-2 bzw. Salk\_110814-3.

Jeweils vier *Arabisidopsis thaliana* Pflanzen der aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangenen Linien A.t.-alpha-OK1-1, A.t.-alpha-OK1-2, A.t.-alpha-OK1-3, A.t.-alpha-OK1-4, A.t.-alpha-OK1-5, bei welchen die Menge an OK1 Protein mittels RNAi Technologie verringert ist, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihren Blattstärkegehalt hin untersucht. Die Verringerung der Menge an OK1 Protein in den jeweiligen Linien wurde mittels Westernblot Analyse nachgewiesen (siehe Fig. 8). Die Bestimmung des Gehaltes von Blattstärke der einzelnen Linien wurde mit Hilfe des Stärke/Starch-Kits der Firma Boehringer Mannheim (Produkt Nr.: 0207748) durchgeführt. Dazu wurden alle Blätter von jeweils vier Pflanzen der einzelnen Linien geerntet, und die Blätter durch Mörsern homogenisiert. 40 mg bis 60 mg des homogenisierten Blattmaterials wurde zwei mal mit jeweils 80% Ethanol gewaschen und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende, nicht in Ethanol lösliche Material wurde nach einmaligem Waschen in 1 ml Wasser gefriergetrocknet, anschließend in 0,5 ml 0,2M KOH bei 95°C für 1 h gelöst und die erhaltene Lösung mit 88 µl 1 M Essigsäure auf einen pH Wert von 7 eingestellt. 25 µl der jeweiligen erhaltenen Lösung wurden mit 50 µl Amylodlucosidase-Lösung (Stärke/Starch-Kit der Firma Boehringer Mannheim, Produkt Nr.: 0207748), der 1 Unit alpha-Amylase (von *Bacillus amyloliquefaciens*, Boehringer, Prod-Nr. 161764) zugegeben wurde, versetzt und bei 55 °C für 1 h inkubiert. 20 µl der mit Amylogucosidase und alpha-Amylase behandelten Lösung wurden anschließend für die Glucosebestimmung mittels enzymatischem gekoppeltem photometrischem Test (siehe Produktinformationsblatt zur Bestimmung von nativer Stärke der Firma Boehringer Ingelheim, Produkt Nr.: 0207748) eingesetzt. Parallel zu den transgenen Linien wurde ebenfalls der Gehalt von Stärke in Blättern von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Columbia) bestimmt. Die Wildtyp-Pflanzen und die transgenen Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert: 12 Stunden Lichtphase gefolgt von 12 Stunden Dunkelphase. Blätter der jeweiligen transgenen Pflanzenlinien und Wildtyp-Pflanzen wurden jeweils ca. 4,5 Wochen nach der Samenkeimung nach Beendigung einer Dunkelphase, nach Beendigung einer Lichtphase und nach Beendigung einer zweiten Dunkelphase, die direkt auf die Lichtphase folgte, geerntet. Je transgener Pflanzenlinie wurden jeweils zwei unabhängige Extrakte hergestellt von welchen jeweils zwei Messungen des Stärkegehaltes durchgeführt wurden. Für Wildtyp-Pflanzen wurden jeweils vier



unabhängige Extrakte hergestellt von welchen jeweils zwei Messungen des Stärkegehaltes durchgeführt wurden. Die Bestimmung der Gehalte an Blattstärke ergab folgende Ergebnisse:

	Linie	Starch content (mg/g FW)	Standardabweichung*
Ende Dunkelphase 1			
	A.t.-alpha-OK1-1	4,09	0,55
	A.t.-alpha-OK1-2	4,93	0,94
	A.t.-alpha-OK1-3	5,59	0,52
	A.t.-alpha-OK1-4	6,36	0,87
	A.t.-alpha-OK1-5	1,49	0,99
	Wildtyp	0,78	0,14
Ende Lichtphase			
	A.t.-alpha-OK1-1	9,30	0,96
	A.t.-alpha-OK1-2	9,86	1,45
	A.t.-alpha-OK1-3	11,68	1,60
	A.t.-alpha-OK1-4	9,53	1,25
	A.t.-alpha-OK1-5	6,61	0,71
	Wildtyp	5,61	0,72
End      Ende Dunkelphase 2			
	A.t.-alpha-OK1-1	3,92	0,83

Starch content		
Linie	(mg/g FW)	Standardabweichung*
A.t.-alpha-OK1-2	4,35	1,07
A.t.-alpha-OK1-3	6,00	0,63
A.t.-alpha-OK1-4	5,34	1,35
A.t.-alpha-OK1-5	1,46	0,56
Wildtyp	0,62	0,18

**Tabelle 4:** Menge der Blattstärke in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, bei welchen die Menge des OK1 Proteins mit Hilfe der RNAi Technologie reduziert ist.

\* Standardabweichung mit der allgemeinen Formel: Wurzel  $[(n\sum x^2 - (\sum x)^2) / n(n-1)]$

5

#### 15. Analyse von Stärke, isoliert aus Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

Stärke wurde aus Blättern der in Beispiel 14 beschriebenen Pflanzen isoliert und nach der unter Allgemeine Methoden Punkt 13 beschriebenen Methode hydrolysiert und anschließend mittels HPAE Analyse aufgetrennt. Die Flächen der mittels HPAE Analyse erhaltenen, aufgetrennten Signale für C-3-Phosphat und C-6-Phosphat wurden berechnet (Software: Chromelion 6.20 der Firma Dionex, USA) und die erhaltenen Werte wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3-Phosphat in Wildtyp-Pflanzen betrug 2,1. In den in Beispiel 14 beschriebenen Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines OK1 Proteins mittels RNAi Technologie verringert war, betrug das C-6-Phosphat zu C-3-Phosphat Verhältnis im Durchschnitt, der mit Hilfe der Analyse von Stärke, isoliert aus den Linien A.t.-alpha-OK1-1, A.t.-alpha-OK1-2, A.t.-alpha-OK1-3, A.t.-alpha-OK1-4 und A.t.-alpha-OK1-5 ermittelt wurde, hingegen 2,5. Den niedrigsten Wert für das Verhältnis C-6-Phosphat zu C-3-Phosphat ergab die Analyse von Stärke der Linie A.t.-alpha-OK1-5 (Verhältnis von 2,2), den höchsten Wert ergab Stärke der Linie A.t.-alpha-OK1-1 (Verhältnis 2,7).

Auch Stärke, isoliert aus Blättern der in Beispiel 13 beschriebenen Mutanten, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, zeigten eine Erhöhung des C-6-Phosphat zu C-3-Phosphat Verhältnisses in den betreffenden Stärken.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin
  - a) Proteinextrakte in voneinander getrennten Ansätzen mit
    - i phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
    - ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucaneninkubiert werden,
  - b) spezifisch an die
    - i alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) i gebundene Proteine und
    - ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) ii gebundene Proteinein getrennten Ansätzen voneinander in Lösung gebracht werden und
  - c) Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt c) i, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt c) ii, aufweisen.
2. Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, worin
  - a) Proteinextrakte mit phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen inkubiert werden,
  - b) spezifisch an die phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) gebundene Proteine in Lösung gebracht werden,
  - c) Proteine erhalten nach Schritt b) jeweils mit
    - i ATP und phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
    - ii ATP und nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanenin voneinander getrennten Ansätzen inkubiert werden,
  - d) das nach Inkubation in Schritt c) i bzw. c) ii erhaltene jeweilige alpha-1,4-Glucan auf Einführung weiterer Phosphatgruppen hin untersucht wird und

- e) Proteine, identifiziert werden, die im Inkubationsanstaz nach c) i signifikante Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben und im Inkubationsanstaz nach c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das Protein mit alpha-1,4-Glucan phosphorylierender, enzymatischer Aktivität phosphorylierte-Stärke als Substrat verwendet.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das Protein mit Stärke phosphorylierender, enzymatischer Aktivität aus einer Pflanze stammt.
- 5. Protein erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 6. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin
  - a) ein Protein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 identifiziert wird,
  - b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden und
  - c) Nucleinsäuremoleküle mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Aminosäuren identifiziert werden.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6, worin zur Identifizierung besagter Nucleinsäuremoleküle nach Schritt c) Nucleinsäureoligonucleotide basierend auf der Aminosäuresequenz ermittelt nach Schritt b) hergestellt werden.
- 8. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, codierend ein Protein, welches alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin
  - a) ein Protein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 identifiziert wird,
  - b) Antikörper, die spezifisch mit dem nach Schritt a) ermittelten Protein reagieren, hergestellt werden und

- c) Nucleinsäuremoleküle mit Hilfe der nach Schritt b) hergestellten Antikörper identifiziert werden.
9. Nucleinsäuremolekül erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 8.
  10. Genetisch modifizierte Pflanzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte enzymatische Aktivität eines Proteins nach Anspruch 5 oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
  11. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 10, die eine Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süßkartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, Arabidopsis, Curcuma oder Sorghum Pflanze ist.
  12. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet dass die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 9, oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 8 in das Genom der Pflanze besteht.
  13. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, nach Anspruch 12, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  14. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 13 die eine modifizierte Stärke synthetisiert, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  15. Pflanzenzelle nach Anspruch 14, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat in C-3-Position der Glucosemoleküle aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  16. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 10 bis 15.

17. Pflanze nach Anspruch 16, die eine Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum Pflanze ist.
18. Pflanze nach Anspruch 17, die eine Mais- oder Weizenpflanze ist.

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von Proteinen die an der Phosphorylierung von Stärke beteiligt sind, sowie Nucleinsäuren, die solche Proteine codieren. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines mit den erfindungsgemäßen Verfahren identifizierbaren Proteins aufweisen. Solche Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, als auch die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke.





1 / 5

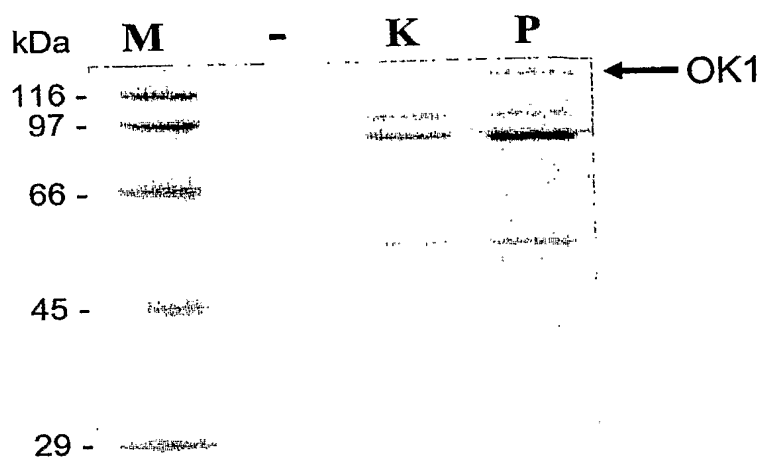


Fig. 1

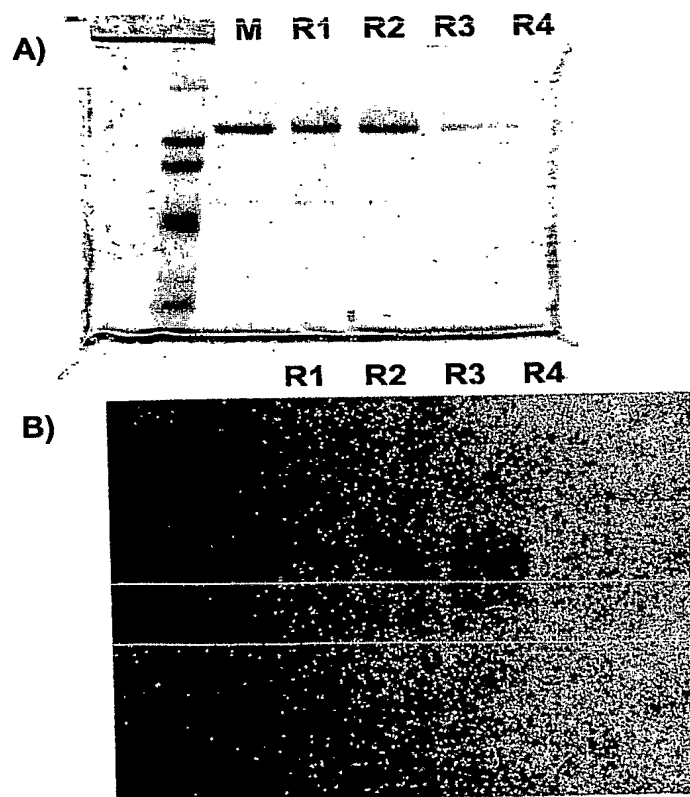


Fig. 2

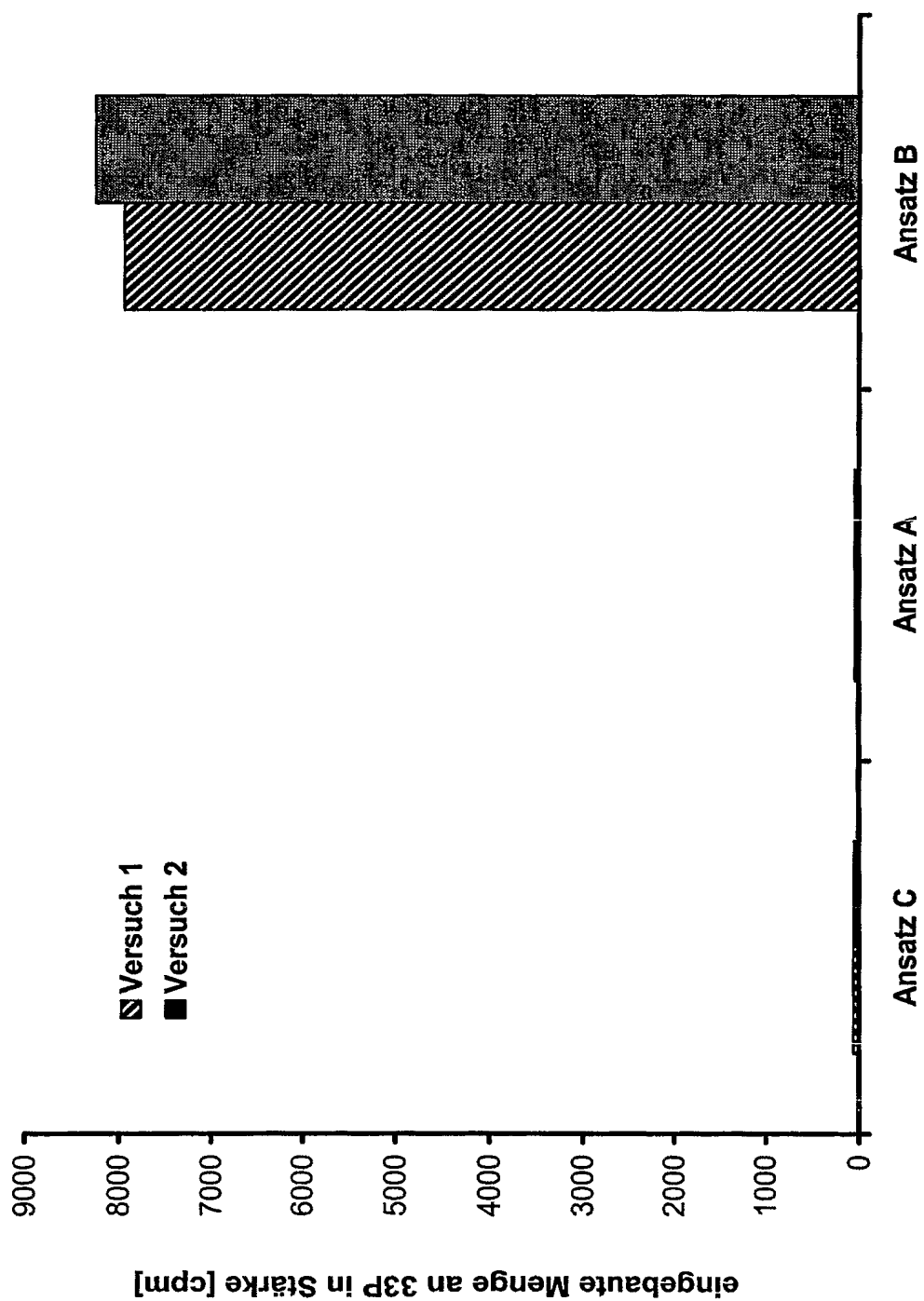


Fig.: 3

4 / 5

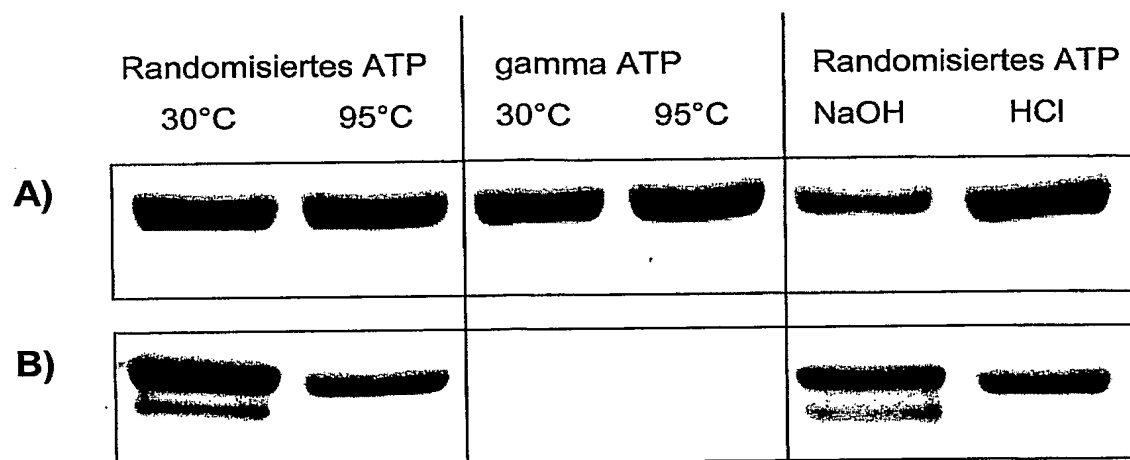


Fig. 5

5 / 5

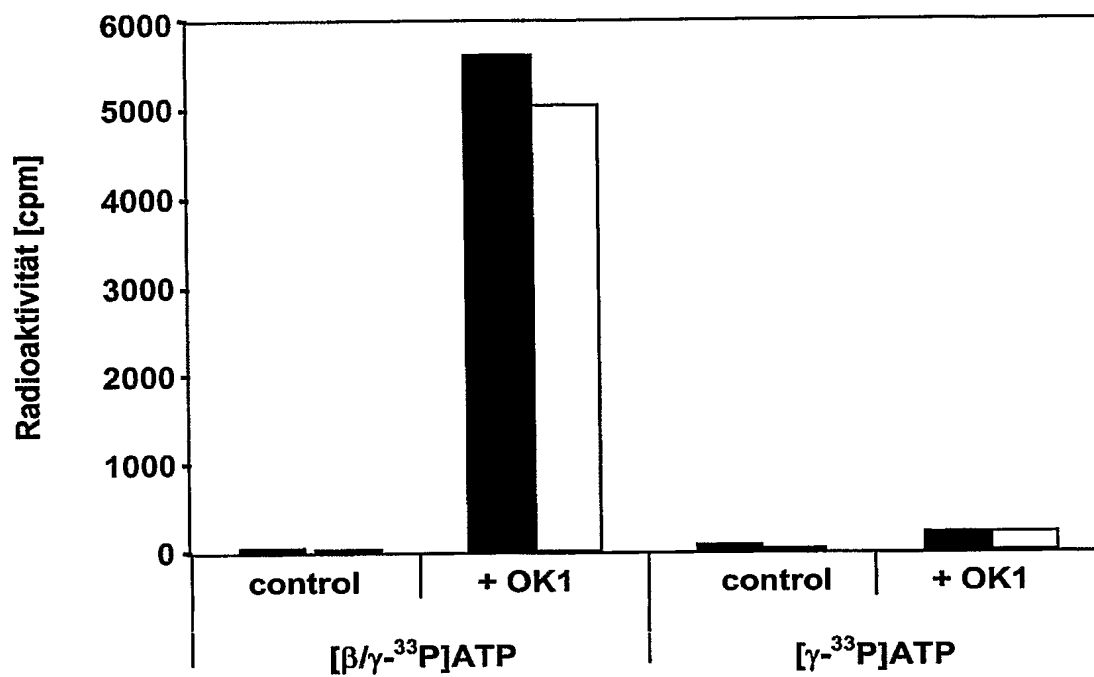


Fig. 6

09-12-2004

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Bayer CropScience GmbH

Bayer CropScience GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit Stärke  
phosphorylierender enzymatischer Aktivität

&lt;130&gt; BCS 04-5016-EP

&lt;160&gt; 26

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3591

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana .

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(3591)

&lt;223&gt;

<400> 1	
atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser 10 Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5	15
act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	
aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Ser	
35 40 45	
cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	
aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

gat	cat	caa	gtt	aat	ttt	ggt	gac	cat	gtg	gct	atg	ttt	gga	tca	gct		288
Asp	His	Gln	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	His	Val	Ala	Met	Phe	Gly	Ser	Ala		
				85					90					95			
aaa	gag	att	ggt	tca	tgg	aaa	aag	aaa	tcg	cct	ttg	aat	tgg	agt	gag		336
Lys	Glu	Ile	Gly	Ser	Trp	Lys	Lys	Lys	Ser	Pro	Leu	Asn	Trp	Ser	Glu		
			100					105					110				
aat	gga	tgg	gtt	tgt	gag	ttg	gaa	ctt	gac	ggt	ggt	cag	gtt	ttg	gag		384
Asn	Gly	Trp	Val	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Gly	Gln	Val	Leu	Glu		
		115					120					125					
tat	aag	ttt	gtc	att	gtt	aag	aat	gat	ggt	tca	ctt	tca	tgg	gaa	tct		432
Tyr	Lys	Phe	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser		
	130					135					140						
ggt	gat	aat	cgt	gtc	ctt	aag	gtt	cca	aat	tct	ggg	aat	ttt	tct	gtt		480
Gly	Asp	Asn	Arg	Val	Leu	Lys	Val	Pro	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Val		
145					150					155					160		
gtt	tgt	cat	tgg	gat	gct	act	aga	gaa	acc	ctt	gat	ttg	cct	cag	gag		528
Val	Cys	His	Trp	Asp	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Glu		
				165					170					175			
gtt	ggt	aat	gat	gat	gat	gtt	ggt	gat	ggt	ggg	cat	gag	agg	gat	aat		576
Val	Gly	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	His	Glu	Arg	Asp	Asn		
			180				185						190				
cat	gat	gtt	ggt	gat	gat	aga	gta	gtg	gga	agt	gaa	aat	ggt	gcg	cag		624
His	Asp	Val	Gly	Asp	Asp	Arg	Val	Val	Gly	Ser	Glu	Asn	Gly	Ala	Gln		
		195					200					205					
ctt	cag	aag	agt	aca	ttg	ggt	ggg	caa	tgg	caa	ggt	aaa	gat	gcg	tcc		672
Leu	Gln	Lys	Ser	Thr	Leu	Gly	Gly	Gln	Trp	Gln	Gly	Lys	Asp	Ala	Ser		
	210					215					220						
ttt	atg	cgt	tct	aat	gat	cat	ggt	aac	aga	gaa	gtt	ggt	aga	aat	tgg		720
Phe	Met	Arg	Ser	Asn	Asp	His	Gly	Asn	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Asn	Trp		
225					230					235					240		
gat	act	agt	ggt	ctt	gaa	ggc	aca	gct	ctt	aag	atg	gtt	gag	ggt	gat		768
Asp	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Ala	Leu	Lys	Met	Val	Glu	Gly	Asp		
				245					250					255			
cgc	aac	tct	aag	aac	tgg	tgg	aga	aag	ctt	gaa	atg	gta	cgc	gag	gtt		816
Arg	Asn	Ser	Lys	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Met	Val	Arg	Glu	Val		
			260					265					270				
ata	gtt	ggg	agt	gtt	gag	agg	gag	gaa	cga	ttg	aag	gcg	ctc	ata	tac		864
Ile	Val	Gly	Ser	Val	Glu	Arg	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr		
		275					280					285					
tct	gca	att	tat	ttg	aag	tgg	ata	aac	aca	ggt	cag	att	cct	tgt	ttt		912
Ser	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Asn	Thr	Gly	Gln	Ile	Pro	Cys	Phe		
	290					295					300						
gaa	gat	gga	ggg	cat	cac	cgt	cca	aac	agg	cat	gcc	gag	att	tcc	aga		960
Glu	Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Arg	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg		
305					310					315					320		
ctt	ata	ttc	cgt	gag	ttg	gag	cac	att	tgc	agt	aag	aaa	gat	gct	act		1008
Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	His	Ile	Cys	Ser	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr		
				325					330					335			
cca	gag	gaa	gtg	ctt	gtt	gct	cgg	aaa	atc	cat	ccg	tgt	tta	cct	tct		1056
Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Cys	Leu	Pro	Ser		
			340					345					350				

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

ttc	aaa	gca	gag	ttt	act	gca	gct	gtc	cct	cta	act	cgg	att	agg	gac	1104
Phe	Lys	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	
		355					360					365				
ata	gcc	cat	cgg	aat	gat	att	cct	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	1152
Ile	Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	
		370				375					380					
cat	acg	ata	caa	aat	aag	ctt	cac	cgg	aat	gct	ggt	cca	gaa	gat	cta	1200
His	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	
		385			390					395					400	
att	gca	aca	gaa	gca	atg	ctt	caa	cga	att	acc	gag	acc	cca	gga	aaa	1248
Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Met	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Pro	Gly	Lys	
				405					410					415		
tat	agt	gga	gac	ttt	gtg	gag	cag	ttt	aaa	ata	ttc	cat	aat	gag	ctt	1296
Tyr	Ser	Gly	Asp	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Lys	Ile	Phe	His	Asn	Glu	Leu	
			420					425					430			
aaa	gat	ttc	ttt	aat	gct	gga	agt	ctc	act	gaa	cag	ctt	gat	tct	atg	1344
Lys	Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Asp	Ser	Met	
		435					440					445				
aaa	att	tct	atg	gat	gat	aga	ggt	ctt	tct	gcg	ctc	aat	ttg	ttt	ttt	1392
Lys	Ile	Ser	Met	Asp	Asp	Arg	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Phe	
		450				455					460					
gaa	tgt	aaa	aag	cgc	ctt	gac	aca	tca	gga	gaa	tca	agc	aat	gtt	ttg	1440
Glu	Cys	Lys	Lys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	
		465			470					475					480	
gag	ttg	att	aaa	acc	atg	cat	tct	cta	gct	tct	tta	aga	gaa	aca	att	1488
Glu	Leu	Ile	Lys	Thr	Met	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Ile	
				485					490					495		
ata	aag	gaa	ctt	aat	agc	ggc	ttg	cga	aat	gat	gct	cct	gat	act	gcc	1536
Ile	Lys	Glu	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala	Pro	Asp	Thr	Ala	
			500					505					510			
att	gca	atg	cgc	cag	aag	tgg	cgc	ctt	tgt	gag	atc	ggc	ctc	gag	gac	1584
Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Leu	Glu	Asp	
		515					520					525				
tac	ttt	ttt	gtt	cta	cta	agc	aga	ttc	ctc	aat	gct	ctt	gaa	act	atg	1632
Tyr	Phe	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Asn	Ala	Leu	Glu	Thr	Met	
		530				535					540					
gga	gga	gct	gat	caa	ctg	gca	aaa	gat	gtg	gga	tca	aga	aac	gtt	gcc	1680
Gly	Gly	Ala	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	
		545			550					555					560	
tca	tgg	aat	gat	cca	cta	gat	gct	ttg	gtg	ttg	ggt	gtt	cac	caa	gta	1728
Ser	Trp	Asn	Asp	Pro	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Val	His	Gln	Val	
				565					570					575		
ggt	cta	tct	ggt	tgg	aag	caa	gaa	gaa	tgt	tta	gcc	att	gga	aat	gaa	1776
Gly	Leu	Ser	Gly	Trp	Lys	Gln	Glu	Glu	Cys	Leu	Ala	Ile	Gly	Asn	Glu	
			580					585					590			
ctc	ctt	gct	tgg	cga	gaa	agg	gac	cta	ctt	gaa	aaa	gaa	ggg	gaa	gag	1824
Leu	Leu	Ala	Trp	Arg	Glu	Arg	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Gly	Glu	Glu	
		595					600					605				
gat	gga	aaa	aca	att	tgg	gcc	atg	agg	ctg	aaa	gca	act	ctt	gat	cga	1872
Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Trp	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
		610				615					620					



## BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

gca Ala 625	cgc Arg	aga Arg	tta Leu	aca Thr	gca Ala 630	gaa Glu	tat Tyr	tct Ser	gat Asp	ttg Leu 635	ctt Leu	ctt Leu	caa Gln	ata Ile	ttt Phe 640	1920
cct Pro	cct Pro	aat Asn	gtg Val	gag Glu 645	att Ile	tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gct Ala 650	cta Leu	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu 655	aat Asn	1968
agt Ser	gtc Val	aag Lys	acc Thr 660	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gag Glu 665	att Ile	cgt Arg	gct Ala	gga Gly	att Ile 670	att Ile	ttc Phe	2016
cag Gln	atc Ile	tca Ser 675	aag Lys	ctc Leu	tgc Cys	act Thr	gtt Val 680	ctt Leu	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	gta Val 685	aga Arg	aat Asn	tca Ser	2064
ctt Leu	ggt Gly 690	tct Ser	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	gat Asp 695	gtc Val	gtt Val	gta Val	cct Pro	gga Gly 700	tgc Ser	acg Thr	tct Ser	ggg Gly	2112
aca Thr 705	tta Leu	gtt Val	cag Gln	gtt Val	gag Glu 710	agc Ser	att Ile	gtt Val	ccg Pro	gga Gly 715	tca Ser	ttg Leu	cca Pro	gca Ala	act Thr 720	2160
tct Ser	ggt Gly	ggt Gly	cct Pro	att Ile 725	att Ile	ctc Leu	ttg Leu	gtc Val	aat Asn 730	aaa Lys	gct Ala	gat Asp	ggc Gly	gat Asp 735	gaa Glu	2208
gag Glu	gta Val	agt Ser	gct Ala 740	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	aac Asn	ata Ile 745	gct Ala	gga Gly	gtc Val	atg Met	ctt Leu 750	ctg Leu	cag Gln	2256
gag Glu	ctg Leu	cct Pro 755	cac His	ttg Leu	tct Ser	cac His	ctt Leu 760	ggc Gly	gtt Val	aga Arg	gcg Ala	cgg Arg 765	cag Gln	gag Glu	aaa Lys	2304
att Ile 770	gtc Val	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	tgt Cys	gat Asp 775	gat Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys	gtt Val 780	gct Ala	gat Asp	ata Ile	cga Arg	2352
cga Arg 785	ctt Leu	gtg Val	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe 790	gtg Val	agg Arg	ttg Leu	gaa Glu	gca Ala 795	tct Ser	cca Pro	agt Ser	cat His	gtg Val 800	2400
aat Asn	ctg Leu	ata Ile	ctt Leu	tca Ser 805	act Thr	gag Glu	ggg Gly	agg Arg	agt Ser 810	cgc Arg	act Thr	tcc Ser	aaa Lys	tcc Ser 815	agt Ser	2448
gcg Ala	acc Thr	aaa Lys	aaa Lys 820	acg Thr	gat Asp	aag Lys	aac Asn	agc Ser 825	tta Leu	tct Ser	aag Lys	aaa Lys 830	aaa Lys	aca Thr	gat Asp	2496
aag Lys	aag Lys	agc Ser 835	tta Leu	tct Ser	atc Ile	gat Asp 840	gat Asp	gaa Glu	gaa Glu	tca Ser	aag Lys	cct Pro 845	ggt Gly	tcc Ser	tca Ser	2544
tct Ser	tcc Ser 850	aat Asn	agc Ser	ctc Leu	ctt Leu	tac Tyr 855	tct Ser	tcc Ser	aag Lys	gat Asp	atc Ile 860	cct Pro	agt Ser	gga Gly	gga Gly	2592
atc Ile 865	ata Ile	gca Ala	ctt Leu	gct Ala	gat Asp 870	gca Ala	gat Asp	gta Val	cca Pro	act Thr 875	tct Ser	ggt Gly	tca Ser	aaa Lys	tct Ser 880	2640
gct Ala	gca Ala	tgt Cys	ggg Gly	ctt Leu 885	ctt Leu	gca Ala	tct Ser	tta Leu	gca Ala 890	gaa Glu	gcc Ala	tct Ser	agt Ser	aaa Lys 895	gtg Val	2688

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

cac	agc	gaa	cac	gga	gtt	ccg	gca	tca	ttt	aag	gtt	cca	act	gga	gtt	2736
His	Ser	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ala	Ser	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Gly	Val	
			900					905					910			
gtc	ata	cct	ttt	gga	tcg	atg	gaa	tta	gct	tta	aag	caa	aat	aat	tcg	2784
Val	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	Asn	Asn	Ser	
		915					920					925				
gaa	gaa	aag	ttt	gcg	tct	ttg	cta	gaa	aaa	cta	gaa	acc	gcc	aga	cct	2832
Glu	Glu	Lys	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	
	930					935					940					
gag	ggg	ggg	gag	cta	gac	gac	ata	tgt	gac	cag	atc	cat	gaa	gtg	atg	2880
Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Asp	Ile	Cys	Asp	Gln	Ile	His	Glu	Val	Met	
945					950					955					960	
aaa	acg	ttg	caa	gtg	cct	aaa	gaa	aca	atc	aac	agc	ata	agc	aaa	gcg	2928
Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	
				965					970						975	
ttt	ctc	aaa	gat	gct	cgt	ctc	att	gtt	cgt	tca	agt	gct	aac	gtc	gag	2976
Phe	Leu	Lys	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	
			980					985						990		
gac	tta	gcc	gga	atg	tca	gct	gca	gga	ctc	tat	gaa	tca	atc	cct	aac	3024
Asp	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Asn	
		995					1000					1005				
gtg	agt	ccc	tcg	gat	cct	ttg	gtg	ttt	tca	gat	tcg	gtt	tgc	caa		3069
Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln		
	1010					1015					1020					
gtt	tgg	gct	tct	ctc	tac	aca	aga	aga	gct	gtt	cta	agc	cgt	aga		3114
Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg		
	1025					1030					1035					
gct	gct	ggg	gtc	tct	caa	aga	gaa	gct	tca	atg	gct	gtt	ctc	gtt		3159
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
	1040					1045					1050					
caa	gaa	atg	ctt	tcg	ccg	gac	tta	tca	ttc	gtt	ctg	cac	aca	gtg		3204
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val		
	1055					1060					1065					
agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct		3249
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala		
	1070					1075					1080					
cct	ggg	tta	ggg	gag	act	tta	gct	tca	gga	aca	aga	gga	aca	cca		3294
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro		
	1085					1090					1095					
tgg	aga	ctc	gct	tcg	ggg	aag	ctc	gac	ggg	att	gta	caa	acc	tta		3339
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu		
	1100					1105					1110					
gct	ttc	gca	aac	ttc	agc	gaa	gag	ctt	ctt	gtg	tca	gga	aca	ggg		3384
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly		
	1115					1120					1125					
cct	gct	gat	gga	aaa	tac	gtt	cgg	ttg	acc	gtg	gac	tat	agc	aaa		3429
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys		
	1130					1135					1140					
aaa	cgt	tta	act	gtt	gac	tcg	gtg	ttt	aga	cag	cag	ctc	ggg	cag		3474
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln		
	1145					1150					1155					

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

aga ctc	ggt tcg	ggt ggt	ttc ttc	ttg gaa	aga aac	ttt ggc	tgt	3519
Arg Leu	Gly Ser	Val Gly	Phe Phe	Leu Glu	Arg Asn	Phe Gly	Cys	
1160			1165		1170			

gct caa	gac gtt	gaa ggt	tgt ttg	ggt gaa	gat gtt	tac att	3564
Ala Gln	Asp Val	Glu Gly	Cys Leu	Val Gly	Glu Asp	Val Tyr	Ile
1175			1180		1185		

ggt cag	tca agg	cca caa	cct ctg	tag	3591
Val Gln	Ser Arg	Pro Gln	Pro Leu		
1190			1195		

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu	Ser Ile	Gly Ser	His Cys	Cys Ser	Ser Pro	Phe Thr	Phe Ile
1		5		10		15	

Thr Arg	Asn Ser	Ser Ser	Ser Leu	Pro Arg	Leu Val	Asn Ile	Thr His
	20		25			30	

Arg Val	Asn Leu	Ser His	Gln Ser	His Arg	Leu Arg	Asn Ser	Asn Ser
	35		40			45	

Arg Leu	Thr Cys	Thr Ala	Thr Ser	Ser Ser	Thr Ile	Glu Glu	Gln Arg
50		55			60		

Lys Lys	Lys Asp	Gly Ser	Gly Thr	Lys Val	Arg Leu	Asn Val	Arg Leu
65		70		75			80

Asp His	Gln Val	Asn Phe	Gly Asp	His Val	Ala Met	Phe Gly	Ser Ala
	85			90			95

Lys Glu	Ile Gly	Ser Trp	Lys Lys	Lys Ser	Pro Leu	Asn Trp	Ser Glu
	100		105			110	

Asn Gly	Trp Val	Cys Glu	Leu Glu	Leu Asp	Gly Gly	Gln Val	Leu Glu
	115		120			125	

Tyr Lys	Phe Val	Ile Val	Lys Asn	Asp Gly	Ser Leu	Ser Trp	Glu Ser
130			135		140		

Gly Asp	Asn Arg	Val Leu	Lys Val	Pro Asn	Ser Gly	Asn Phe	Ser Val
145		150		155			160

Val Cys	His Trp	Asp Ala	Thr Arg	Glu Thr	Leu Asp	Leu Pro	Gln Glu
		165		170			175

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn  
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln  
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser  
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp  
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp  
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val  
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr  
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe  
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg  
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr  
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser  
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp  
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys  
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu  
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys  
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu  
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met  
435 440 445

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe  
     450                            455                            460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu  
     465                            470                            475                            480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile  
                             485                            490                            495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala  
                     500                            505                            510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp  
             515                            520                            525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met  
     530                            535                            540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala  
     545                            550                            555                            560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val  
                     565                            570                            575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu  
             580                            585                            590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu  
             595                            600                            605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg  
     610                            615                            620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe  
     625                            630                            635                            640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn  
                     645                            650                            655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe  
             660                            665                            670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser  
             675                            680                            685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly  
     690                            695                            700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr  
     705                            710                            715                            720

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu  
725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln  
740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys  
755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg  
770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val  
785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser  
805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp  
820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser  
835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly  
850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser  
865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val  
885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val  
900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser  
915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro  
930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met  
945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala  
965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu  
980 985 990

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn  
995 1000 1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln  
1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg  
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val  
1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val  
1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala  
1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro  
1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu  
1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly  
1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys  
1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln  
1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys  
1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
1190 1195

<210> 3

<211> 3644

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

## BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13)..(3633)

&lt;223&gt;

<400> 3  
cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata 51  
Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile  
1 5 10

ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt 99  
Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Gly Val Gly  
15 20 25

gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc 147  
Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg  
30 35 40 45

ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca 195  
Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr  
50 55 60

aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc 243  
Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu  
65 70 75

cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att 291  
Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile  
80 85 90

atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg 339  
Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu  
95 100 105

gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa 387  
Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu  
110 115 120 125

aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat 435  
Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp  
130 135 140

aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat 483  
Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp  
145 150 155

ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta 531  
Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu  
160 165 170

gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag 579  
Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys  
175 180 185

aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa 627  
Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys  
190 195 200 205

gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc 675  
Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala  
210 215 220

gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc 723  
Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe



BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
225 230 235

atg Met	aga Arg	tca Ser 240	aat Asn	gag Glu	cat His	ctg Leu	aat Asn 245	aag Lys	gag Glu	gct Ala	gat Asp	agg Arg 250	atg Met	tgg Trp	gat Asp	771
aca Thr	act Thr 255	ggg Gly	ctt Leu	gat Asp	gga Gly	ata Ile 260	gca Ala	ctg Leu	aaa Lys	ctg Leu	gtg Val 265	gag Glu	ggc Gly	gat Asp	aaa Lys	819
gca Ala 270	tcc Ser	agg Arg	aac Asn	tgg Trp	tgg Trp 275	cgg Arg	aag Lys	tta Leu	gag Glu	gtt Val 280	gtt Val	cgc Arg	ggg Gly	ata Ile	ttg Leu 285	867
tca Ser	gaa Glu	tct Ser	ttt Phe	gat Asp 290	gac Asp	cag Gln	agt Ser	cgt Arg	ctg Leu 295	ggg Gly	gcc Ala	ctt Leu	gta Val	tac Tyr 300	tca Ser	915
gct Ala	att Ile	tat Tyr	ctg Leu 305	aag Lys	tgg Trp	att Ile	tat Tyr	aca Thr 310	ggt Gly	cag Gln	ata Ile	tcg Ser	tgc Cys 315	ttt Phe	gaa Glu	963
gat Asp	ggt Gly	ggc Gly 320	cac His	cat His	cgg Arg	cct Pro	aac Asn 325	aaa Lys	cat His	gct Ala	gag Glu	ata Ile 330	tcg Ser	agg Arg	caa Gln	1011
ata Ile	ttc Phe 335	cgt Arg	gaa Glu	ctt Leu	gaa Glu	atg Met 340	atg Met	tat Tyr	tat Tyr	ggg Gly	aaa Lys 345	acc Thr	aca Thr	tca Ser	gcc Ala	1059
aag Lys 350	gat Asp	gtt Val	ctc Leu	gtg Val	att Ile 355	cgc Arg	aaa Lys	att Ile	cat His	ccc Pro 360	ttt Phe	tta Leu	cct Pro	tca Ser	ttt Phe 365	1107
aag Lys	tca Ser	gag Glu	ttt Phe	aca Thr 370	gcc Ala	tct Ser	gtc Val	cct Pro	cta Leu 375	aca Thr	cga Arg	att Ile	cgt Arg	gat Asp 380	att Ile	1155
gct Ala	cac His	cgg Arg	aat Asn 385	gac Asp	atc Ile	cca Pro	cat His	gat Asp 390	ctc Leu	aag Lys	caa Gln	gaa Glu	atc Ile 395	aag Lys	cat His	1203
act Thr	ata Ile	caa Gln	aac Asn	aaa Lys	ctt Leu	cat His	cgt Arg 405	aat Asn	gct Ala	gga Gly	cct Pro	gag Glu 410	gat Asp	ctt Leu	att Ile	1251
gct Ala	aca Thr 415	gaa Glu	gtc Val	atg Met	ctt Leu	gct Ala 420	agg Arg	att Ile	act Thr	aag Lys	acc Thr 425	cct Pro	gga Gly	gaa Glu	tac Tyr	1299
agt Ser 430	gaa Glu	aca Thr	ttt Phe	gtt Val	gaa Glu 435	caa Gln	ttc Phe	acg Thr	ata Ile	ttt Phe 440	tat Tyr	agc Ser	gaa Glu	cta Leu	aaa Lys 445	1347
gat Asp	ttc Phe	ttc Phe	aat Asn 450	gct Ala	ggc Gly	agc Ser	cta Leu	ttt Phe	gag Glu 455	caa Gln	ctg Leu	gag Glu	tcc Ser	atc Ile 460	aag Lys	1395
gaa Glu	tct Ser	ctg Leu	aac Asn 465	gag Glu	tca Ser	ggc Gly	tta Leu	gaa Glu 470	gtt Val	ctc Leu	tca Ser	tcc Ser	ttt Phe 475	gtg Val	gaa Glu	1443
acc Thr	aaa Lys	agg Arg 480	agt Ser	ttg Leu	gac Asp	caa Gln	gtg Val 485	gat Asp	cat His	gca Ala	gaa Glu	gat Asp 490	ttg Leu	gat Asp	aaa Lys	1491
aat Asn	gat Asp	acc Thr	att Ile	caa Gln	att Ile	ttg Leu	atg Met	act Thr	acc Thr	ttg Leu	caa Gln	tca Ser	tta Leu	tct Ser	tct Ser	1539

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
495 500 505

cta Leu 510	aga Arg	tcg Ser	gtt Val	cta Leu	atg Met 515	aag Lys	ggc Gly	ctt Leu	gaa Glu	agt Ser 520	ggc Gly	ctt Leu	aga Arg	aat Asn	gat Asp 525	1587
gcg Ala	cct Pro	gat Asp	aat Asn	gct Ala 530	ata Ile	gca Ala	atg Met	cga Arg	caa Gln 535	aag Lys	tgg Trp	cgc Arg	ctt Leu	tgt Cys 540	gaa Glu	1635
att Ile	agt Ser	ctt Leu	gag Glu 545	gat Asp	tat Tyr	tca Ser	ttt Phe 550	gtt Val	ctg Leu	tta Leu	agc Ser	aga Arg	ttc Phe 555	atc Ile	aat Asn	1683
act Thr	ctt Leu	gaa Glu 560	gcc Ala	tta Leu	ggt Gly	gga Gly	tca Ser 565	gct Ala	tca Ser	ctt Leu	gca Ala	aag Lys 570	gat Asp	gta Val	gct Ala	1731
aga Arg	aat Asn 575	act Thr	act Thr	cta Leu	tgg Trp	gat Asp 580	act Thr	act Thr	ctt Leu	gat Asp	gcc Ala 585	ctt Leu	gtc Val	att Ile	ggc Gly	1779
atc Ile 590	aat Asn	caa Gln	gtt Val	agc Ser	ttt Phe 595	tca Ser	ggt Gly	tgg Trp	aaa Lys	aca Thr 600	gat Asp	gaa Glu	tgt Cys	att Ile	gcc Ala 605	1827
ata Ile	ggg Gly	aat Asn	gag Glu	att Ile 610	ctt Leu	tcc Ser	tgg Trp	aag Lys	caa Gln 615	aaa Lys	ggt Gly	cta Leu	tct Ser	gaa Glu 620	agt Ser	1875
gaa Glu	ggt Gly	tgt Cys	gaa Glu 625	gat Asp	ggg Gly	aaa Lys	tat Tyr	att Ile 630	tgg Trp	tca Ser	cta Leu	aga Arg	ctt Leu 635	aaa Lys	gct Ala	1923
aca Thr	ctg Leu	gac Asp 640	aga Arg	gca Ala	cgg Arg	aga Arg	tta Leu 645	acg Thr	gaa Glu	gag Glu	tac Tyr	tct Ser 650	gaa Glu	gca Ala	ctt Leu	1971
ctt Leu 655	tct Ser	ata Ile	ttc Phe	cct Pro	gaa Glu	aaa Lys 660	gta Val	atg Met	gtt Val	att Ile	ggg Gly 665	aaa Lys	gcc Ala	ctt Leu	gga Gly	2019
ata Ile 670	cca Pro	gat Asp	aac Asn	agt Ser	gtg Val 675	aga Arg	act Thr	tac Tyr	aca Thr	gag Glu 680	gca Ala	gaa Glu	att Ile	cgt Arg	gct Ala 685	2067
ggc Gly	att Ile	gtt Val	ttt Phe	cag Gln 690	gta Val	tct Ser	aaa Lys	cta Leu	tgc Cys 695	aca Thr	gta Val	ctt Leu	cag Gln	aaa Lys 700	gca Ala	2115
att Ile	cga Arg	gaa Glu	gta Val 705	ctt Leu	gga Gly	tca Ser	act Thr	ggc Gly 710	tgg Trp	gat Asp	gtt Val	ctt Leu	gtt Val 715	cct Pro	gga Gly	2163
gtg Val	gcc Ala	cat His 720	gga Gly	act Thr	ctg Leu	atg Met	cgg Arg 725	gtg Val	gaa Glu	aga Arg	att Ile 730	ctt Leu	cct Pro	gga Gly	tca Ser	2211
tta Leu 735	cct Pro	tca Ser	tct Ser	gtc Val	aaa Lys	gaa Glu 740	cct Pro	gtg Val	gtt Val	cta Leu	att Ile 745	gta Val	gat Asp	aag Lys	gct Ala	2259
gat Asp 750	gga Gly	gat Asp	gaa Glu	gag Glu	gtc Val 755	aaa Lys	gct Ala	gct Ala	ggg Gly	gat Asp 760	aat Asn	ata Ile	gtt Val	ggt Gly	gtt Val 765	2307
att Ile	ctt Leu	ctt Leu	cag Gln	gaa Glu	cta Leu	cct Pro	cac His	ctt Leu	tca Ser	cat His	ctt Leu	ggt Gly	gtt Val	aga Arg	gct Ala	2355

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
770 775 780

cgt	caa	gag	aat	ggt	gta	ttt	gta	act	tgt	gaa	tat	gat	gac	aca	gtt	2403
Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	
			785					790					795			
aca	gat	gtg	tat	ttg	ctt	gag	gga	aaa	tat	atc	aga	tta	gaa	gca	tca	2451
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	
		800					805					810				
tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	gtt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	2499
Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala	
	815					820					825					
gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	2547
Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	
830					835					840					845	
caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	2595
Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met	
				850					855					860		
tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggg	agt	ttt	gct	gct	ctt	2643
Ser	Lys	Gln	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	
			865					870					875			
gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggg	gca	aaa	gct	gct	gca	2691
Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	
		880					885					890				
tgc	aga	act	ctt	tct	gtt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	2739
Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	
	895					900					905					
gat	caa	gga	gtt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggg	gct	gtg	ata	2787
Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	
910					915					920					925	
cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcg	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	2835
Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	
				930					935					940		
tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	2883
Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	
			945					950					955			
ggg	gaa	gtt	gat	agc	ctg	gcg	ttg	gag	cta	caa	gca	ata	att	tca	cat	2931
Gly	Glu	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	His	
		960					965					970				
ctt	tcc	cca	ccg	gag	gag	act	att	ata	ttt	ctc	aaa	aga	atc	ttc	cca	2979
Leu	Ser	Pro	Pro	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Phe	Pro	
	975					980					985					
cag	gat	gtc	cgg	ttg	att	gtt	aga	tct	agt	gct	aat	gtg	gag	gat	ttg	3027
Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Asp	Leu	
990					995					1000					1005	
gct	ggg	atg	tca	gct	gct	ggg	ctc	tat	gat	tca	att	ccc	aat	gtc		3072
Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ile	Pro	Asn	Val		
				1010					1015					1020		
agt	ctc	atg	gac	cca	tgt	gcc	ttt	gga	gct	gcg	gtt	ggg	aag	gtt		3117
Ser	Leu	Met	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Val		
				1025					1030					1035		
tgg	gct	tct	tta	tac	aca	agg	aga	gcc	atc	cta	agc	cgt	cga	gcc		3162
Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala		

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
1040 1045 1050

gct ggt gtt tat cag Ala Gly Val Tyr Gln 1055	aga gac gcg aca atg Arg Asp Ala Thr Met 1060	gct gtt ctt gtc caa Ala Val Leu Val Gln 1065	3207
gaa ata ctg cag cca Glu Ile Leu Gln Pro 1070	gat ctc tcc ttc gtg Asp Leu Ser Phe Val 1075	ctt cat act gtt tgc Leu His Thr Val Cys 1080	3252
ccc gct gac cat gac Pro Ala Asp His Asp 1085	ccc aag gtt gtc cag Pro Lys Val Val Gln 1090	gct gag gtc gcc cct Ala Glu Val Ala Pro 1095	3297
ggg ctg ggt gaa acg Gly Leu Gly Glu Thr 1100	ctt gct tca gga acc Leu Ala Ser Gly Thr 1105	cgt ggc acc ccg tgg Arg Gly Thr Pro Trp 1110	3342
agg ctg tca tgt aac Arg Leu Ser Cys Asn 1115	aaa ttc gat gga aaa Lys Phe Asp Gly Lys 1120	gtt gcc act ctt gcc Val Ala Thr Leu Ala 1125	3387
ttt tca aat ttc agt Phe Ser Asn Phe Ser 1130	gag gag atg gtg gtg Glu Glu Met Val Val 1135	cac aac tct ggt cct His Asn Ser Gly Pro 1140	3432
gcc aat gga gaa gta Ala Asn Gly Glu Val 1145	att cgt ctt act gtt Ile Arg Leu Thr Val 1150	gat tac agc aag aag Asp Tyr Ser Lys Lys 1155	3477
cca ttg tcg gtt gat Pro Leu Ser Val Asp 1160	aca acc ttt agg aag Thr Thr Phe Arg Lys 1165	cag ttt ggt cag cga Gln Phe Gly Gln Arg 1170	3522
ctg gct gcg att ggc Leu Ala Ala Ile Gly 1175	cag tat ctg gag cag Gln Tyr Leu Glu Gln 1180	aag ttc ggg agt gca Lys Phe Gly Ser Ala 1185	3567
cag gat gtg gaa ggt Gln Asp Val Glu Gly 1190	tgc ctg gtt ggg aaa Cys Leu Val Gly Lys 1195	gat att ttt ata gtg Asp Ile Phe Ile Val 1200	3612
caa agc agg cca cag Gln Ser Arg Pro Gln 1205	cca tag aagccgaatt c Pro		3644

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val  
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala  
seite 15

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
35 40 45

Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys  
50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys  
65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser  
85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr  
100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val  
115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp  
130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe  
145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu  
165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly  
180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp  
195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser  
210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser  
225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly  
245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg  
260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser  
275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr  
290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
 305 310 315 320

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg  
 325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val  
 340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu  
 355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg  
 370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln  
 385 390 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu  
 405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr  
 420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe  
 435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
 450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg  
 465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr  
 485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
 500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp  
 515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu  
 530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu  
 545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr  
 565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln  
 580 585 590 595

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
580 585 590

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn  
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys  
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp  
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile  
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp  
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val  
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu  
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His  
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser  
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp  
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu  
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu  
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val  
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn  
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr  
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu  
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln  
Seite 18

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser  
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr  
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly  
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly  
915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr  
930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val  
945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro  
965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val  
980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met  
995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met  
1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser  
1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val  
1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu  
1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp  
1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly  
1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser  
1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn



Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly  
1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser  
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala  
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg  
1190 1195 1200

Pro Gln Pro  
1205

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryza sativa, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg  
1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 6

Ser Arg Arg Val Ala Gly Val  
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

<400> 7

Val Glu Ala Glu Val Ala Pro  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 8

His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp  
1 5

<210> 9

<211> 807

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(590)

<223>

<400> 9

cg	gca	cga	gga	gtc	ctc	ccc	aat	gtg	agc	ctc	tcg	gac	cca	acc	aac	47
	Ala	Arg	Gly	Val	Leu	Pro	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	Thr	Asn	
1				5						10					15	

ttc	ggg	tct	gca	gta	gcg	cgg	gtc	tgg	gcc	tcg	ctg	tac	act	cgg	agg	95
Phe	Gly	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	
			20						25					30		

gcc	atc	ctc	agc	cgc	cgg	gtg	gct	ggc	gtg	ccc	cag	agg	gac	gcc	aag	143
Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Gln	Arg	Asp	Ala	Lys	
			35					40					45			

atg	gct	gtc	ctg	gtg	cag	gag	atg	ctg	gag	cca	gag	cta	tcc	ttc	gtg	191
Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Met	Leu	Glu	Pro	Glu	Leu	Ser	Phe	Val	
		50					55					60				

ctc	cac	acg	gtc	agc	ccc	tcg	gac	cac	gac	acc	agg	gtc	gtc	gag	gct	239
Leu	His	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Val	Val	Glu	Ala	
	65					70					75					

gag	gtt	gcc	ccg	ggg	ctg	ggc	gag	acc	ctt	gcc	gct	ggc	acc	cgc	ggc	287
Glu	Val	Ala	Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Arg	Gly	
80					85					90					95	

## BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

acc ccg tgg cgt ctc tcc tgc gac aag ttc gac acc gac gtc gcc acc 335  
 Thr Pro Trp Arg Leu Ser Cys Asp Lys Phe Asp Thr Asp Val Ala Thr  
 100 105 110

ctg gcc ttc gcc aac ttc agt gag gag atg cgg gtg ctc ggc tcg ggc 383  
 Leu Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Met Arg Val Leu Gly Ser Gly  
 115 120 125

ccc gcc gac ggc gag gtg gtg agg ctc act gtc gac tac agc acg aag 431  
 Pro Ala Asp Gly Glu Val Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Thr Lys  
 130 135 140

ctg ctc tcc gtc gac agg acc ttc agg cag aag ttc ggt cag cgg ctg 479  
 Leu Leu Ser Val Asp Arg Thr Phe Arg Gln Lys Phe Gly Gln Arg Leu  
 145 150 155

gcc gcc gtg ggc cag tac ctg gag cag agg ttc ggc agc gcc cag gac 527  
 Ala Ala Val Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Arg Phe Gly Ser Ala Gln Asp  
 160 165 170 175

gtg gag ggc tgc atg gtc tgg gaa gac atc tac ata gtg cag agc atg 575  
 Val Glu Gly Cys Met Val Trp Glu Asp Ile Tyr Ile Val Gln Ser Met  
 180 185 190

cca caa ccg ctg tag agtcatccgt aataatgttt agatgagcaa agtttttggtt 630  
 Pro Gln Pro Leu 195

ggtgaaataa aatttgccga aaatcccatg gcaaaataag tcagggtatga agagcccgcc 690

tgcgaaacca actgattcta aataatgttt tgaattcgtg tttaaattat gggacgtgaa 750

caatgatttc cttggaatgc atgcattgta agtttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 807

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 195

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hordeum vulgare

&lt;400&gt; 10

Ala Arg Gly Val Leu Pro Asn Val Ser Leu Ser Asp Pro Thr Asn Phe  
 1 5 10 15

Gly Ser Ala Val Ala Arg Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala  
 20 25 30

Ile Leu Ser Arg Arg Val Ala Gly Val Pro Gln Arg Asp Ala Lys Met  
 35 40 45

Ala Val Leu Val Gln Glu Met Leu Glu Pro Glu Leu Ser Phe Val Leu  
 50 55 60

His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp Thr Arg Val Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Val Ala Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ala Gly Thr Arg Gly Thr

Pro Trp Arg Leu Ser Cys Asp Lys Phe Asp Thr Asp Val Ala Thr Leu  
100 105 110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Met Arg Val Leu Gly Ser Gly Pro  
115 120 125

Ala Asp Gly Glu Val Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Thr Lys Leu  
130 135 140

Leu Ser Val Asp Arg Thr Phe Arg Gln Lys Phe Gly Gln Arg Leu Ala  
145 150 155 160

Ala Val Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Arg Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
165 170 175

Glu Gly Cys Met Val Trp Glu Asp Ile Tyr Ile Val Gln Ser Met Pro  
180 185 190

Gln Pro Leu  
195

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Pro Glu Glu Cys Lys Ala Val Gly Asn  
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 12

Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr  
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

<213> solanum tuberosum

<400> 13

Arg Phe Val Asn Ala Val Glu  
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> solanum tuberosum

<400> 14

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys  
1 5

<210> 15

<211> 403

<212> DNA

<213> solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(402)

<223>

<400> 15

gcg gat gct tca ata gct atg cgt cag aag tgg cgt ctc tgc gaa atc	48
Ala Asp Ala Ser Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile	
1 5 10 15	

ggg ctt gaa gac tat gca ttt gtt ctt ttg agc agg ttt gtg aat gca	96
Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala	
20 25 30	

gtt gaa gct cta ggc gga gct gat tgg ctt gca gag aat gta aca gtg	144
Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val	
35 40 45	

aaa aac att agt tct tgg aat gat cca att gga gca ctt aca gtt gga	192
Lys Asn Ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro Ile Gly Ala Leu Thr Val Gly	
50 55 60	

atc caa cag cta ggt ata tct ggt tgg aag ccc gag gaa tgc aaa gct	240
Ile Gln Gln Leu Gly Ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala	
65 70 75 80	

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

gtt gga aat gaa ctt ttg tca tgg aaa gaa agg ggt att tca gaa att	288
Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly Ile Ser Glu Ile	
85 90 95	
gaa ggc agc gaa gat ggt aag act ata tgg gca tta aga cta aaa gcg	336
Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala	
100 105 110	
act ctt gat aga agt cga agg tta act gag gag tat tcc gag aca ctt	384
Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu	
115 120 125	
ctc caa ata ttc cct gaa a	403
Leu Gln Ile Phe Pro Glu	
130	

<210> 16

<211> 134

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 16

Ala Asp Ala Ser Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile  
1 5 10 15

Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala  
20 25 30

Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val  
35 40 45

Lys Asn Ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro Ile Gly Ala Leu Thr Val Gly  
50 55 60

Ile Gln Gln Leu Gly Ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala  
65 70 75 80

Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly Ile Ser Glu Ile  
85 90 95

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala  
100 105 110

Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu  
115 120 125

Leu Gln Ile Phe Pro Glu  
130

<210> 17

<211> 7

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 17

Asp Gly Gly His His Arg Pro  
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 18

Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala  
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 19

Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr  
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 20

Val Asn Lys Ala Asp Gly  
1 5

<210> 21

<211> 1526

<212> DNA

<213> Sorghum bicolor

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(1525)

&lt;223&gt;

```

<400> 21
g cac gag gct gaa tat gtt cat gat cag agt cac ctg gag gct ctt aca 49
His Glu Ala Glu Tyr Val His Asp Gln Ser His Leu Glu Ala Leu Thr
1 5 10 15

tat tct gca ata tat cta aag tgg ata tat act ggt caa ata cca tgc 97
Tyr Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Pro Cys
20 25 30

ttt gag gat ggt ggt cac cat cga ccc aat aaa cat gct gag ata tcc 145
Phe Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser
35 40 45

agg caa att ttt cgt gaa att gaa agg ata tac tat ggg gaa aac aca 193
Arg Gln Ile Phe Arg Glu Ile Glu Arg Ile Tyr Tyr Gly Glu Asn Thr
50 55 60

tca gct cag gat ttg ctt gtg ata cgc aag att cat cct tgt cta cct 241
Ser Ala Gln Asp Leu Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro
65 70 75

tca ttt aaa tca gaa ttt act gcc tct gtt cct cta aca cga att cgt 289
Ser Phe Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg
85 90 95

gat att gct cat cgt aat gac ata cca cat gat ctc aag caa gaa atc 337
Asp Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile
100 105 110

aag cat act ata caa aac aag ctt cac cgg aat gcc ggc cct gag gat 385
Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp
115 120 125

ctt att gct act gaa gcc atg ctt gct agg att act aag act cct gga 433
Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly
130 135 140

gag tac agt gaa gct ttt gtt gaa caa ttc aag acg ttt tat agt gaa 481
Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu
145 150 155 160

tta aaa gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ctg gag caa gtg caa tcc 529
Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser
165 170 175

atc gag caa tct ttg gat gag tct ggc tta gaa gct ctc tca tcc ttt 577
Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe
180 185 190

ctg aaa acc aaa aag aat tta gac caa ctg gaa gat gca aaa gat ttg 625
Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu
195 200 205

gat gaa aat ggt ggc gtt caa gtt ttg ttg aaa gcc ttg ctg tcg tta 673
Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu

```



BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
210 215 220

tct Ser 225	tat Tyr	cta Leu	aga Arg	tca Ser	att Ile 230	cta Leu	atg Met	aag Lys	ggg Gly	ctg Leu 235	gaa Glu	agt Ser	ggc Gly	ctt Leu	aga Arg 240	721
aat Asn	gat Asp	gct Ala	cca Pro	gat Asp 245	agt Ser	gct Ala	att Ile	gca Ala	atg Met 250	cga Arg	caa Gln	aag Lys	tgg Trp	cgt Arg 255	ctt Leu	769
tgt Cys	gag Glu	atc Ile	ggg Gly 260	ctt Leu	gaa Glu	gat Asp	tat Tyr	tcg Ser 265	ttt Phe	gta Val	ttg Leu	tta Leu	agt Ser 270	aga Arg	tac Tyr	817
atc Ile	aat Asn	gct Ala 275	ctt Leu	gaa Glu	gct Ala	ttg Leu	ggg Gly 280	gga Gly	tca Ser	gct Ala	tca Ser	ctt Leu 285	gca Ala	gag Glu	ggg Gly	865
ctt Leu	cct Pro 290	aca Thr	aat Asn	aca Thr	agt Ser	cta Leu 295	tgg Trp	gat Asp	gat Asp	gcc Ala	ctt Leu 300	gat Asp	gcc Ala	ctt Leu	gtc Val	913
att Ile 305	ggc Gly	ata Ile	aat Asn	caa Gln	ggt Val 310	agc Ser	ttt Phe	tca Ser	gga Gly	tgg Trp 315	aaa Lys	cca Pro	aat Asn	gag Glu	tgt Cys 320	961
act Thr	gca Ala	ata Ile	gtg Val	aat Asn 325	gag Glu	ctt Leu	ctt Leu	tct Ser	tgg Trp 330	aag Lys	cag Gln	aaa Lys	ggg Gly	cta Leu 335	tct Ser	1009
gaa Glu	ttt Phe	gaa Glu	ggc Gly 340	agt Ser	gag Glu	gat Asp	gga Gly	aag Lys 345	tat Tyr	att Ile	tgg Trp	gca Ala	ctg Leu 350	aga Arg	ctc Leu	1057
aaa Lys	gcc Ala	act Thr 355	ctt Leu	gat Asp	aga Arg	tca Ser	cga Arg 360	aga Arg	cta Leu	aca Thr	gaa Glu	gaa Glu 365	tac Tyr	tct Ser	gaa Glu	1105
gca Ala	ctt Leu 370	ctt Leu	tct Ser	ata Ile	ttt Phe	cct Pro 375	gaa Glu	aaa Lys	gtc Val	aag Lys	gtt Val 380	ctt Leu	ggg Gly	aaa Lys	gcc Ala	1153
ctt Leu 385	gga Gly	ata Ile	cca Pro	gag Glu	aac Asn 390	agt Ser	gtg Val	aga Arg	aca Thr	tac Tyr 395	act Thr	gaa Glu	gct Ala	gaa Glu	att Ile 400	1201
cgt Arg	gct Ala	ggg Gly	gtt Val	att Ile 405	ttt Phe	cac His	gtc Val	tcg Ser	aaa Lys 410	ctt Leu	tgc Cys	act Thr	gta Val	ctt Leu 415	tta Leu	1249
aaa Lys	gca Ala	act Thr	cga Arg 420	gca Ala	gtt Val	ctt Leu	gga Gly	tcg Ser 425	tct Ser	gtg Val	tgg Trp	gat Asp	gtt Val 430	ctt Leu	gtt Val	1297
cct Pro	gga Gly	gtg Val 435	gcc Ala	cat His	gga Gly	gcc Ala	ttg Leu 440	ata Ile	cag Gln	gtt Val	gaa Glu	aga Arg 445	ata Ile	gct Ala	cct Pro	1345
gga Gly	tca Ser 450	ttg Leu	cca Pro	tca Ser	tcc Ser	atc Ile 455	aaa Lys	gaa Glu	cct Pro	gtc Val	gtg Val 460	cta Leu	gtt Val	gta Val	aac Asn	1393
aag Lys 465	gct Ala	gat Asp	gga Gly	gat Asp	gaa Glu 470	gag Glu	gtc Val	aaa Lys	gct Ala	gct Ala 475	ggg Gly	gat Asp	aac Asn	ata Ile	gtg Val 480	1441
ggg Gly	gtt Val	att Ile	ctt Leu	cta Leu	caa Gln	gaa Glu	tta Leu	cct Pro	cac His	cta Leu	tca Ser	cat His	ctt Leu	ggg Gly	gtt Val	1489

aga gct cgt caa gag aaa gtt gta ttt gta act tgc g 1526  
Arg Ala Arg Gln Glu Lys Val Val Phe Val Thr Cys  
500 505

<210> 22

<211> 508

<212> PRT

<213> sorghum bicolor

<400> 22

His Glu Ala Glu Tyr Val His Asp Gln Ser His Leu Glu Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Tyr Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Pro Cys  
20 25 30

Phe Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser  
35 40 45

Arg Gln Ile Phe Arg Glu Ile Glu Arg Ile Tyr Tyr Gly Glu Asn Thr  
50 55 60

Ser Ala Gln Asp Leu Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro  
65 70 75 80

Ser Phe Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg  
85 90 95

Asp Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile  
100 105 110

Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp  
115 120 125

Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly  
130 135 140

Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu  
145 150 155 160

Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser  
165 170 175

Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe  
180 185 190

Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu  
Seite 29

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
195 200 205

Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu  
210 215 220

Ser Tyr Leu Arg Ser Ile Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg  
225 230 235 240

Asn Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu  
245 250 255

Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr  
260 265 270

Ile Asn Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Gly  
275 280 285

Leu Pro Thr Asn Thr Ser Leu Trp Asp Asp Ala Leu Asp Ala Leu Val  
290 295 300

Ile Gly Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Pro Asn Glu Cys  
305 310 315 320

Thr Ala Ile Val Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser  
325 330 335

Glu Phe Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ala Leu Arg Leu  
340 345 350

Lys Ala Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu  
355 360 365

Ala Leu Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Lys Val Leu Gly Lys Ala  
370 375 380

Leu Gly Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile  
385 390 395 400

Arg Ala Gly Val Ile Phe His Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu  
405 410 415

Lys Ala Thr Arg Ala Val Leu Gly Ser Ser Val Trp Asp Val Leu Val  
420 425 430

Pro Gly Val Ala His Gly Ala Leu Ile Gln Val Glu Arg Ile Ala Pro  
435 440 445

Gly Ser Leu Pro Ser Ser Ile Lys Glu Pro Val Val Leu Val Val Asn  
450 455 460

Lys Ala Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25  
 465 470 475 480

Gly Val Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val  
 485 490 495

Arg Ala Arg Gln Glu Lys Val Val Phe Val Thr Cys  
 500 505

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 23

Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly  
 1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 24

Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp Asp  
 1 5

<210> 25

<211> 509

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(507)

<223>

<400> 25

aat ggc gct ttt gtc gaa caa ttt caa ata ttt tat agc gaa cta aaa  
 Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys  
 1 5 10 15

48

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

gac ttc ttt aat gcc ggc agc ctg ttt gaa caa ctg gaa tcc atc aag	96
Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys	
20 25 30	
gaa tct ttg aat gat tct ggc tta gaa gca ctg tca tca ttt gtc aaa	144
Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys	
35 40 45	
acc aaa cag agt ttg gac caa gtg gat gct gcg aac att caa gtt gtg	192
Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val	
50 55 60	
atg aag acc ttg cag tca ttg tct tca ttg aga tca gtt cta atg aag	240
Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys	
65 70 75 80	
ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat gcg act gat gcc ggt ata gca	288
Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala	
85 90 95	
atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gag att ggt ctt gag gat tat tct	336
Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser	
100 105 110	
ttt gtt ttg tta agc aga tat atc aat ggt ctt gaa gct tca ggt gga	384
Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly	
115 120 125	
tca gct tca ctt gca caa tgt gtg gct gga aat aca agt gta tgg gac	432
Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp	
130 135 140	
gat acc ctt gat gcc ctt att att ggc gtc aat caa gtt agc ttt tca	480
Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser	
145 150 155 160	
ggt tgg aag cca gag gaa tgc att gct at	509
Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala	
165	

<210> 26

<211> 169

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 26

Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys  
1 5 10 15

Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys  
20 25 30

Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys  
35 40 45

Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val  
50 55 60

BCS 04-5016\_SEQUENZPROTOKOLL\_Verfahren zur Identifizierung.ST25

Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys  
65 70 75 80

Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala  
85 90 95

Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser  
100 105 110

Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly  
115 120 125

Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp  
130 135 140

Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser  
145 150 155 160

Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala  
165

